



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ALEJANDRO YOPASA ARENAS

**MODELAGEM DA MOBILIDADE DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS EM SOLOS:
ANÁLISE GEORREFERENCIADA DA EXPOSIÇÃO À POLUIÇÃO DOS SOLOS E
ÁGUAS SUBTERRÂNEAS BRASILEIROS E EFEITOS DA MATÉRIA ORGÂNICA
DE CAMA DE FRANGO NO TRANSPORTE FACILITADO POR COLOIDES EM
COLUNAS DE SOLO SATURADAS**

**CAMPINAS
2019**

ALEJANDRO YOPASA ARENAS

**MODELAGEM DA MOBILIDADE DE FÁRMACOS VETERINÁRIOS EM SOLOS:
ANÁLISE GEORREFERENCIADA DA EXPOSIÇÃO À POLUIÇÃO DOS SOLOS E
ÁGUAS SUBTERRÂNEAS BRASILEIROS E EFEITOS DA MATÉRIA ORGÂNICA
DE CAMA DE FRANGO NO TRANSPORTE FACILITADO POR COLOIDES EM
COLUNAS DE SOLO SATURADAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em
Ciências

Orientadora: Profa. Dra. Anne Helene Fostier

**O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno
Alejandro Yopasa Arenas e orientada pela Profa. Dra. Anne Helene Fostier.**

**CAMPINAS
2019**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Y81m Yopasa Arenas, Alejandro, 1989-
Modelagem da mobilidade de fármacos veterinários em solos: análise Georreferenciada da exposição à poluição dos solos e águas subterrâneas brasileiros e efeitos da matéria orgânica de cama de frango no transporte facilitado por coloides em colunas de solo saturadas / Alejandro Yopasa Arenas. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Anne Helene Fostier.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fármacos veterinários. 2. Solos. 3. Modelagem de dados. 4. PARAFAC. 5. Espectroscopia de correlação bidimensional. I. Fostier, Anne Hélène, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Modelling of pharmaceuticals transport in soils: georeferenced analysis of Brazilian soil and groundwater exposure to pollution and effects of the organic matter of poultry litter in the colloid-facilitated transport in saturated soil columns.

Palavras-chave em inglês:

Veterinary drugs

Soils

Data modeling

Parallel Factors Analysis

Two-dimensional correlation spectroscopy

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Anne Helene Fostier [Orientador]

José Roberto Guimarães

Ronei Jesus Poppi

Rafael Mingoti

Marinônio Lopes Cornélio

Data de defesa: 02-12-2019

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2981-6946>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3986054357408158>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Anne Helene Fostier (Orientador)

Prof. Dr. José Roberto Guimarães (UNICAMP)

Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (UNICAMP)

Dr. Rafael Mingoti (Embrapa Territorial)

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio (UNESP)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno **ALEJANDRO YOPASA ARENAS**, aprovada pela Comissão Julgadora em 2 de dezembro de 2019.

Dedico esta tese aos familiares, amigos, trabalhadores da UNICAMP e, em especial a minha orientadora por permitirem meu livre desenvolvimento na pós-graduação ao mesmo tempo que me permitiram o meu crescimento como pai.

AGRADECIMENTOS

À Alexandra, ao Daniel e ao Kevin pelo impulso para vir e para manter-me no Brasil.

Ao pessoal do CPG do IQ da UNICAMP, em especial a Bel e Gabriela e ao professor Dr. Ricaurte Rodríguez Angulo da Universidad Nacional de Colombia pelo apoio no processo de inscrição à pós-graduação no IQ desde Colômbia.

À professora Dra. Anne Helene Fostier pelo aceite para ser seu aluno e por sua constante orientação, apoio acadêmico, pessoal, dedicação, paciência, e por ter recebido meu trabalho de forma profissional.

Aos meus companheiros do Grupo de Química Ambiental (GQA) e do grupo de preparação de amostras e mecanização (GEPAM) pelo apoio e companhia durante todo meu processo de formação.

Ao pessoal técnico-administrativo do Instituto pelo apoio durante a etapa experimental.

Ao pessoal do Instituto Agronômico de Campinas por sua colaboração na coleta e análises das amostras de solo utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Fernando Menten, do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agronomia da Universidade de São Paulo (ESALQ, USP) por sua colaboração na realização do experimento de antibioterapia de frangos e na coleta das amostras de cama de frango utilizadas neste trabalho.

Aos professores que me permitiram estudar e aprofundar meus conhecimentos principalmente em espectroscopia, quimiometria e desenho experimental através de aulas e da revisão e avaliação do conteúdo deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do projeto temático Nº 2013/09543-7

RESUMO

Os antimicrobianos são extensamente usados para o tratamento de animais. Sua produção, consumo e subsequente liberação no ambiente tem despertado um grande interesse devido às evidências que indicam a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos e outros efeitos destes contaminantes emergentes. Apesar do amplo consumo, estudos sobre a presença, mobilidade e toxicidade de antimicrobianos no ambiente brasileiro ainda são escassos. A interação do fármaco com a matéria orgânica (MO) de fezes animais e componentes do solo desempenha um papel importante na determinação da sua distribuição entre os diferentes compartimentos ambientais. Os modelos para a avaliação de risco de contaminação ou transporte no solo dependem da escala de observação, pois a complexidade e a disponibilidade de dados variam. Assim, este trabalho foi dividido em três partes destinadas a estudar o problema desde a escala molecular até a escala geográfica. Para o estudo macroscópico do transporte de fármacos em solos e águas subterrâneas brasileiros, foi realizado um modelo baseado em dados socioeconômicos, geológicos e hidroclimáticos que mostram uma ampla área do sudeste do Brasil como vulnerável à poluição por antimicrobianos utilizados na alimentação animal. O estudo de transporte em colunas de solo no laboratório foi feito por meio de modelos de cotransporte facilitado por coloides, para os quais foi necessário realizar experimentos para a definição de dezenas de parâmetros que permitiram modelar com o módulo c-ride do Hydrus 1-D tanto o transporte de matéria orgânica quanto dos fármacos. Para o desenvolvimento desta parte do trabalho foi também necessário otimizar o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) para extração dos fármacos e limpeza dos extratos presentes no sistema multi-matrizes (esterco-solo-água). Diferenças consideráveis encontradas no transporte de MO em função do tipo de solos exigiram o estudo dos componentes desta MO. Isto foi realizado por meio da decomposição de matrizes de excitação-emissão de fluorescência (EEM) utilizando a técnica de análise de fatores paralelos (PARAFAC). Finalmente, para o estudo em escala molecular das interações MO do solo/fezes/molécula de fármaco foi proposto o uso da técnica de correlação bidimensional (2D-COS) para facilitar o estudo e comparação de espectros de IR e de fluorescência sincronizada. Os métodos propostos e os resultados obtidos devem auxiliar em estudos de avaliação de risco de contaminação de solos e águas subterrâneas por fármacos.

ABSTRACT

Antimicrobials are widely used for the treatment of animals. Their production, consumption and subsequent release into the environment have aroused great interest due to the evidence indicating the selection of antimicrobial resistant bacteria and other effects of these emerging contaminants. Despite widespread consumption, studies on the presence, mobility and toxicity of antimicrobials in the Brazilian environment are still scarce. The interaction of the drug with the organic matter (OM) of animal feces and soil components plays an important role in determining its distribution among different environmental compartments. Models for risk assessment of soil contamination or transport depend on the scale of observation as the complexity and data availability vary. Thus, this work was divided into three parts designed to study the problem from the molecular scale to the cartographic scale. For the macroscopic study of antimicrobial transport in Brazilian soil and groundwater, a model based on socioeconomic, geological and hydro-climatic data was performed, showing a large area of southeastern Brazil as vulnerable to pollution by antimicrobials used in animal feed. The study of transport in soil columns in the laboratory was carried out through colloid-facilitated co-transport models, for which experiments are required to define dozens of parameters that allowed modeling with the Hydrus 1-D c-ride module of both the transport of organic matter and organic pollutants. For the development of this part of the work, it was also necessary to optimize the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extracting drugs and cleaning the extracts present in the multi-matrix system (dung-soil-water). Considerable differences found in OM transport as a function of soil type required the study of the components of this OM, this was accomplished by the decomposition of fluorescence excitation-emission matrices (EEM) using the parallel factor analysis technique (PARAFAC). Finally, for the molecular scale study of soil / feces colloids / drug molecule /OM interactions, the use of two-dimensional correlation technique (2D-COS) was proposed to facilitate the study and comparison of IR and synchronized fluorescence spectra. The proposed methods and the results obtained should assist in risk assessment studies of drug and soil and groundwater contamination.

Sumário

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introdução..... | 13 |
| 2 | Modelagem do risco de poluição de solos e águas subterrâneas por fármacos usados como agentes anticoccidianos e como promotores de crescimento | 15 |
| 2.1 | Introdução | 15 |
| 2.2 | Métodos..... | 16 |
| 2.3 | Avaliação da produção e liberação de produto veterinário..... | 17 |
| 2.4 | Avaliação do nível de exposição de águas subterrâneas e solos à contaminação | 22 |
| 2.5 | Avaliação das consequências | 27 |
| 2.6 | Mapas de risco | 28 |
| 2.7 | Análise de sensibilidade | 31 |
| 3 | Estudo do processo de cotransporte facilitado pela matéria orgânica dissolvida. 34 | |
| 3.1 | Introdução | 34 |
| 3.2 | Materiais e Métodos | 37 |
| 3.2.1 | Caracterização dos solos estudados | 37 |
| 3.2.2 | Desenho da coluna e empacotamento do solo..... | 39 |
| 3.2.3 | Modelo..... | 40 |
| 3.2.4 | Estudo de transporte da água com o uso de um traçador conservativo ... | 45 |
| 3.2.5 | Estudo de transporte da matéria orgânica de cama de frango | 46 |
| 3.2.6 | Estudo de transporte dos fármacos da cama de frango. | 47 |
| 3.2.7 | Transporte dos fármacos em colunas de solo | 50 |
| 3.3 | Resultados | 51 |
| 3.3.1 | Estudo de transporte da água com o uso de um traçador conservativo ... | 51 |
| 3.3.2 | Curva de ruptura de matéria orgânica dissolvida (MOD)..... | 52 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.3.3 | Otimização do método analítico..... | 53 |
| 3.3.4 | Estudos de eficiência do método QuEChERS para extração dos fármacos | 55 |
| 3.3.5 | Curva de ruptura de fármacos | 58 |
| 3.3.6 | Modelagem das curvas de ruptura experimentais. | 59 |
| 4 | Caracterização da matéria orgânica dissolvida (MOD) no processo de transporte por meio da análise de matrizes de excitação-emissão (EEM) por meio da técnica PARAFAC | 67 |
| 4.1 | Introdução | 67 |
| 4.2 | PARAFAC para o estudo da natureza e transporte dos componentes da MOD | 71 |
| 4.2.1 | Introdução..... | 71 |
| 4.2.2 | Método..... | 72 |
| 4.2.3 | Resultados..... | 73 |
| 4.3 | Espectroscopia de correlação bidimensional (2D-COS) para o estudo da interação de fármacos veterinários com a matéria orgânica dissolvida de solos (MODS)..... | 82 |
| 4.3.1 | Introdução..... | 82 |
| 4.3.2 | Materiais e métodos | 83 |
| 4.3.3 | Resultados..... | 84 |
| 5 | Conclusões Gerais | 88 |
| 6 | Referências..... | 91 |
| 7 | ANEXOS..... | 102 |

1 Introdução

Os antimicrobianos são substâncias produzidas por via sintética ou natural, usadas para inibir o crescimento de microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas, em particular protozoários (EC 2003). Os antimicrobianos são extensamente usados para o tratamento de doenças em humanos e animais. Sua produção, consumo e subsequente liberação no ambiente tem despertado um grande interesse devido a evidências que indicam a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos e outros efeitos destes contaminantes emergentes nos compartimentos ambientais (WHO 2014; Brandt et al. 2015; O'Neill 2016).

Apesar desse consumo generalizado, estudos sobre a presença, o destino e a toxicidade de antimicrobianos no ambiente brasileiro ainda são poucos, sendo limitados a um baixo número de compostos, a maioria dos quais foram detectados em ambientes aquáticos (Pereira et al. 2012; Montagner et al. 2017). Como fontes principais destes poluentes estão as residências, os hospitais, as indústrias e os estabelecimentos agropecuários (Narvaez V. and Jimenez C. 2012). Os antimicrobianos entram no ambiente principalmente pela deposição direta de urina e fezes no solo ou águas, ou indiretamente, quando aplicados ao solo junto com materiais utilizados como fertilizantes, por exemplo a cama de frango.

A interação entre fármaco e solo desempenha um papel importante na determinação da sua distribuição entre os diferentes compartimentos ambientais (solo/água subterrânea/águas superficiais). Os métodos que podem ser utilizados para o estudo deste transporte e a forma de avaliar a interação de fármacos com os componentes do solo dependem da escala de observação, pois o estudo pode ser feito desde a escala molecular até a escala global. Assim, este trabalho foi dividido em três partes para tentar contemplar o conjunto descrito. Na primeira parte do trabalho desenvolveu-se um estudo macroscópico do transporte de fármacos na escala de país (Brasil). Com esta finalidade, propôs-se a criação de dados georeferenciados para avaliar o risco de exposição de solos e águas subterrâneas do Brasil à contaminação por antimicrobianos.

Na escala da bancada de laboratório propôs-se o estudo de transporte de fármacos em pequenas colunas de solos saturadas. Para tentar simular da melhor forma possível o processo, foram utilizados solos naturais e amostras de cama de frango obtidas de experimentos controlados de antibioterapia. Nesta etapa, a obtenção de dados experimentais de transporte em função do tempo ou distância necessitou a otimização de um método analítico apropriado para esta finalidade. Avaliou-se assim o potencial do QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) para a extração e limpeza do sistema multi-matrizes (esterco-solo-água). Para avaliar numericamente o transporte de fármacos e matéria orgânica desprendida da cama de frango nestas colunas de solo saturadas, foram utilizadas ferramentas de código aberto como o Hydrus 1-D.

Finalmente, para melhor entender o processo das interações em nível molecular, foi realizada uma caracterização estrutural e um estudo de interações entre os componentes da matéria orgânica natural e os fármacos. Com esta finalidade, foi proposto o estudo de medidas espectrofotométricas (espectroscopia de fluorescência e no infravermelho com transformada de Fourier) associadas a técnicas quimiométricas/matemáticas como são o PARAFAC e a correlação bidimensional (2D-COS).

2 Modelagem do risco de poluição de solos e águas subterrâneas por fármacos usados como agentes anticoccidianos e como promotores de crescimento

2.1 Introdução

O rebanho bovino no Brasil é de aproximadamente 212 milhões de cabeças, sendo o segundo maior no mundo, atrás dos Estados Unidos (ABPA 2017). O estoque de galináceos é de uns 1,3 bilhões de cabeças, o terceiro maior do mundo (IBGE 2015; FAO 2017). Para aumentar a taxa de conversão energética e a eficiência alimentar destes animais existem diversos aditivos no mercado, muitos dos quais são antimicrobianos. Estes podem ser usados como agentes terapêuticos, profiláticos, ou como promotores de crescimento (Marcucci et al. 2014). Para os BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) foi estimado que o consumo de antimicrobianos deve dobrar entre 2010 e 2030 (O'Neill 2015). Para o Brasil, a partir do consumo de ração animal, Van Boeckel et al. (2015) estimaram que o consumo de antimicrobianos deve passar de 5680 toneladas em 2010 para 10053 toneladas em 2030. Para a avaliação do risco ambiental podem ser estudados os fatores que afetam a sorção e a degradação dos poluentes no solo. Estes fatores dependem das características físico-químicas tanto do composto estudado como do solo, além da atividade microbiológica e do clima (Torre et al. 2012; Singer et al. 2016).

Os compostos farmacologicamente ativos (as vezes também chamados de ingredientes ativos) são moléculas complexas com propriedades e funcionalidades físico-químicas e biológicas diversas. Estes são desenvolvidos e usados geralmente devido a sua atividade biológica e são caracterizados notavelmente pela sua natureza iônica. A massa molar varia tipicamente de 200 até 1000 Dalton. Estes compostos ativos são assim considerados como moléculas pequenas e são aqueles que são pesquisados e detectados no meio ambiente. Outros componentes das formulações farmacêuticas, como excipientes, corantes e pigmentos, são considerados de pouca

relevância ambiental (Kümmerer 2008). Além dos compostos ativos, os seus metabolitos e produtos de transformação vêm sendo cada vez mais relevantes como objeto de estudo. Os metabolitos resultam da mudança estrutural dentro do corpo humano ou de animais tratados com fármacos. Os produtos de transformação são aqueles que resultam de reações bióticas ou abióticas após a excreção, em plantas de tratamento ou no meio ambiente (Slana and Sollner-Dolenc 2016).

É necessário o desenvolvimento de ferramentas metodológicas para estimar a vulnerabilidade à poluição em áreas relevantes geograficamente, com o fim de facilitar a vigilância ou o acompanhamento em áreas onde possa haver maior risco. Os Sistemas de Informação Geográfica (SIG) são necessários para o Brasil, devido ao tamanho do país e sua importância no mercado de produção animal. Nos SIG é possível analisar a variação geográfica do uso de antimicrobianos e inferir o risco de contaminação. O princípio básico é que maior a quantidade de animais, maior a quantidade de antimicrobianos presentes e maior a vulnerabilidade do solo e das águas à contaminação.

2.2. Métodos

O modelo desenvolvido neste trabalho é qualitativo e apresenta um cenário de pior-caso. O risco é calculado pela combinação de três mapas/camadas: uma de liberação, uma de exposição e uma de consequências, como pode ser visto na figura 1. A concentração previsível no ambiente (*Predicted Environmental Concentration-PEC*) é calculada por uma fórmula que relaciona dados de número de animais, dose, período de tratamento, ciclos de produção e dados de bioacessibilidade/biodisponibilidade dos compostos. O risco de lixiviação dos compostos foi caracterizado para cada composto como proposto na norma ISO 15175 (ISO 2011). O potencial de poluição de solos foi avaliado para cada antimicrobiano como uma função de suas taxas de adsorção (b_0) e dissipação (e_0). Estas taxas foram calculadas usando dados georeferenciados de carbono orgânico, médias de temperatura, balanço hídrico e parâmetros hidrogeológicos. As consequências foram modeladas baseadas nos usos do solo Brasileiro (segundo classificação do IBGE). Este trabalho já foi publicado em Yopasa-

Arenas and Fostier (2018a), onde podem ser encontrados maiores detalhes, como tabelas de valores que não serão reproduzidas nas seguintes subseções.

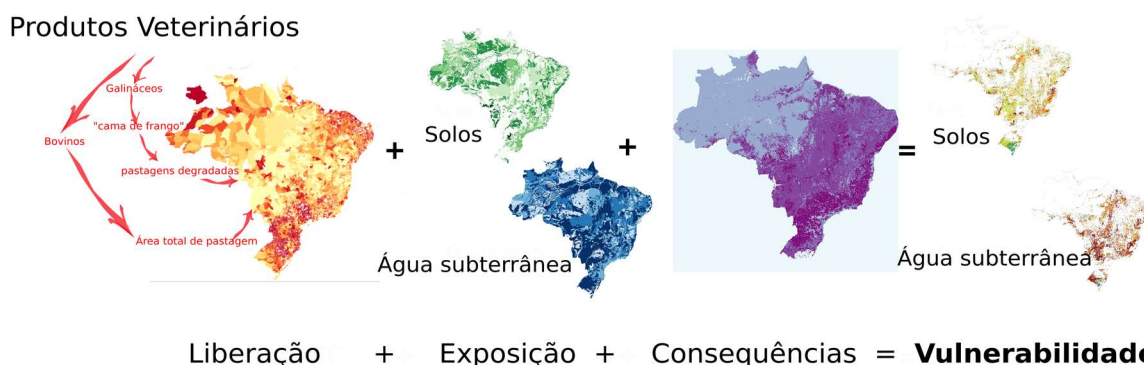


Figura 1: Resumo gráfico do modelo aditivo usado para calcular o risco de poluição de solos e águas subterrâneas por antimicrobianos.

2.3 Avaliação da produção e liberação de produto veterinário

O primeiro passo foi prever as quantidades de fármacos liberados no solo. As fórmulas para calcular a concentração previsível no ambiente (PEC, do inglês *Predicted Environmental Concentration*) propostas pela agência europeia de medicamentos (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) correspondem a uma realidade diferente da encontrada no Brasil (EMA 2008) uma vez que as práticas pecuárias e o regime climático são diferentes. Nesta parte do trabalho foram coletadas informações de diversas fontes que permitiram obter uma fórmula para a PEC mais adequada à realidade brasileira. Destaca-se também que foram considerados apenas os principais rebanhos do país: galináceos e bovinos.

A PEC pode ser calculada de diferentes formas. A fórmula pode variar dependendo da região, uma vez que o uso, a deposição e o destino do fármaco dependem de fatores espaciais. Neste trabalho foi considerado um sistema de produção intensivo para galináceos. Nesse, as fezes das aves caem num material absorvente que funciona como depósito (cama de frango). Após um número de ciclos de produção foi considerado que este material foi depositado em pastagens degradadas com fins de

remediação, o que corresponde a uma destinação final frequente para estes resíduos (Hahn 2004).

As equações (1) e (2) foram utilizadas para o cálculo da $PEC_{solo.p}$ (EMA 2008):

$$PEC_{solo.p} = \frac{Q_p}{A_d} \times Q_d \quad (1)$$

$$Q_p = (n \times dose_p \times w \times t \times p_{cy}) \left(1 - \alpha_p \left(0.01 - \frac{\beta_p}{10000} \right) \right) \quad (2)$$

Sendo :

PEC_{solo} : concentração previsível no ambiente em miligramas por unidade de área por ano ($\text{mg m}^{-2} \text{ano}^{-1}$)

Q_p : quantidade de antimicrobiano gerado por ano (mg)

A_d : área das pastagens degradadas por município em metros quadrados (m^2), obtida do último censo da agricultura do IBGE (2006)

n : número de galináceos

$dose_p$: dose de antimicrobiano em miligramas por quilograma de peso vivo por dia ($\text{mg kg}^{-1} \text{dia}^{-1}$)

w : massa da ave média (kg) = 2,8 kg

t : período de tratamento (dias)

p_{cy} : ciclos de produção por ano $\simeq 8$ (1 ciclo $\simeq 45$ dias) (Hahn 2004)

α_p : Quantidade de antimicrobiano que não é absorvido pela ave (100 - % bioacessibilidade em galináceos)

β_p : Quantidade de antimicrobiano que é absorvido pela ave mais não é metabolizado e sai novamente pelas fezes do animal (100 - % biodisponibilidade em galináceos)

Os dados sobre o uso de medicamentos veterinários e os parâmetros utilizados para a determinação do PEC são apresentados com referências em Yopasa-Arenas and Fostier (2018)

Para os bovinos foi considerado um sistema de produção no qual os animais pastam durante todo o ciclo. Assim, o resíduo de antimicrobiano cai diretamente no solo através das fezes. A $PEC_{solo.c}$ foi calculada pelas equações (3) e (4):

$$PEC_{solo.c} = \frac{Q_c}{A} \quad (3)$$

$$Q_c = (n \times dose_c \times t) \left(1 - \alpha_c \left(0.01 - \frac{\beta_c}{10000} \right) \right) \quad (4)$$

Sendo:

$PEC_{solo.c}$: concentração previsível no ambiente em miligramas por unidade de área por ano ($mg\ m^{-2}\ ano^{-1}$)

Q_c : quantidade de antimicrobiano gerado por ano (mg)

A : Área de pastagem total por município em metros quadrados (m^2), obtido do último censo da agricultura do IBGE (2006)

n : número de bovinos

$dose_c$: dose de antimicrobiano em miligramas por animal por dia ($mg\ animal^{-1}\ dia^{-1}$)

t : período de tratamento (dias)

α_c : Quantidade de antimicrobiano que não é absorvido pelo bovino (100 - % bioacessibilidade em bovinos)

β_c : Quantidade de antimicrobiano que é absorvido pelo bovino mais não é metabolizado e sai novamente pelas fezes do animal (100 - % biodisponibilidade)

As equações (1) a (4) calculam a PEC em miligramas por unidade de área por ano ($mg\ m^{-2}\ ano^{-1}$). Isso se deve ao fato que neste ponto o modelo não usa uma profundidade de penetração nem uma densidade de solo constante. Para calcular o potencial de lixiviação é usado um modelo baseado na norma ISO 15175:2011 (ISO 2011), como mostrado nas seções seguintes. O cálculo da PEC conforme a EMA fica em microgramas de composto por quilograma de solo (EMA 2008), só que na sua formulação não está incluída a variação espacial das características físico-químicas do solo, assunto que este trabalho pretende aprofundar.

O número de animais (n), para 5453 dos 5570 municípios do Brasil, foi obtido a partir de dados brutos da Pesquisa da pecuária Municipal (PPM) do IBGE (Instituto

Brasileiro de Geografia e Estatística) (IBGE 2016). Antes de poder trabalhar os dados com ferramentas de SIG, estes devem estar numa forma consistente e tecnicamente correta. O processo para obter este tipo de conjunto de dados é chamado limpeza de dados (De Jonge and Van Der Loo 2013). O software utilizado para limpeza de dados do IBGE relativos ao Perfil da Pecuária Municipal e para todo o tratamento estatístico neste trabalho foi o R (R Core Team 2018). Para o tratamento dos dados georreferenciados foi utilizado o QGIS 2.14.17-Essen. Estes softwares foram escolhidos devido à grande aceitação que possuem na comunidade; ambos são gratuitos, funcionam em diversos sistemas operacionais e são de acesso livre ou *open-source*. Também foi possível executar alguns algoritmos do R a partir do QGIS, o que tornou mais eficiente a gestão e a visualização dos dados. Dentro do R, os pacotes que foram especialmente utilizados foram o dplyr para manipulação de dados (Wickham and Francois 2015), e o ggplot2 para visualização (Wickham 2009).

Foram definidos alguns compostos de interesse através da análise de dados sobre uso e produção de aditivos anticoccidianos (AA) e os melhoradores de desempenho (MD), aprovados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e amplamente utilizados no sistema de produção animal (MAPA 2015). A figura 2 representa os dados do MAPA numa forma que permite diferenciar a dinâmica comercial destes fármacos veterinários. A figura 2a mostra os compostos usados como aditivos melhoradores de desempenho (MD), junto com o número de produtos registrados e o número de empresas que os produzem. Na figura 2b são representados os dados da tabela correspondente aos compostos utilizados como aditivos anticoccidianos (AA). A partir da análise destas figuras, bacitracina de zinco, colistina, monensina e tilosina foram selecionados como compostos prioritários no campo dos melhoradores de desempenho, e novamente a monensina junto com a salinomicina no campo dos aditivos anticoccidianos.

Pode se concluir da figura que a família de antimicrobianos que conta com a maior dinâmica comercial na área de anticoccidianos e melhoradores de desempenho no Brasil é a dos ionóforos poliéteres (monensina, salinomicina, lasalocida, narasina, maduramicina). A análise gráfica proposta é uma aproximação e não corresponde necessariamente com o nível real de vendas e uso. Entretanto, devido à dificuldade em encontrar informação sobre a uso ou venda de fontes confiáveis, e considerando os resultados da análise anterior, justifica-se incluir os antibióticos ionóforos como

compostos de interesse analítico no presente estudo. Estes compostos são caracterizados pela presença de anéis de tetraidrofurano e tetraidropirano conectados por pontes alifáticos ou através de ligações C-C, possuem função carboxílica, grupos alquila e variedade de grupos oxigênio funcionais. Estas características estruturais fazem com que estes compostos facilitem o transporte de cátions através de membranas lipídicas (Brimble 2003). Como mostrado acima, a monensina é usada tanto como aditivo melhorador de desempenho e quanto como aditivo anticoccidiano. A monensina foi introduzida nos Estados Unidos em 1971 como agente anticoccidiano em aves. Entretanto, devido a sua eficácia hoje, é utilizada também em bovinos e ovinos. Desta forma, mais animais foram medicados com ionóforos como a monensina para o controle de enfermidades que com qualquer outro agente farmacêutico na história da medicina veterinária (Chapman et al. 2010).

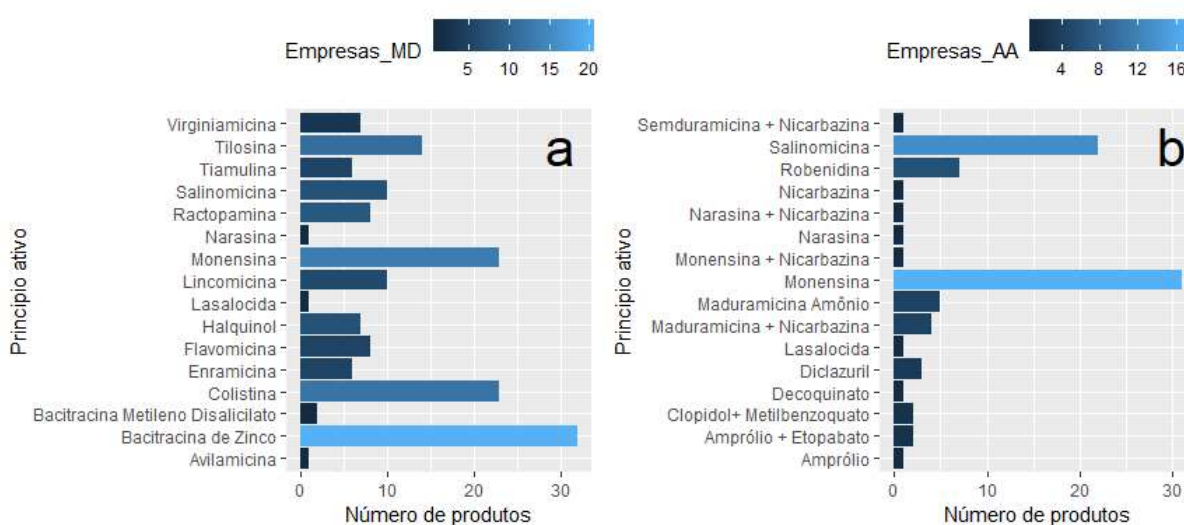


Figura 2: Dinâmica comercial dos aditivos melhoradores de desempenho (a) e anticoccidianos (b), baseada no número de produtos registrados no MAPA e no número de empresas produtoras

Definidos os compostos a estudar, as equações da PEC e os dados geograficamente referenciados, foi possível construir o primeiro mapa do modelo, o de quantidade liberada de fármaco. A figura 3 ilustra o processo para a monensina, mas o mesmo procedimento foi realizado para os outros compostos.

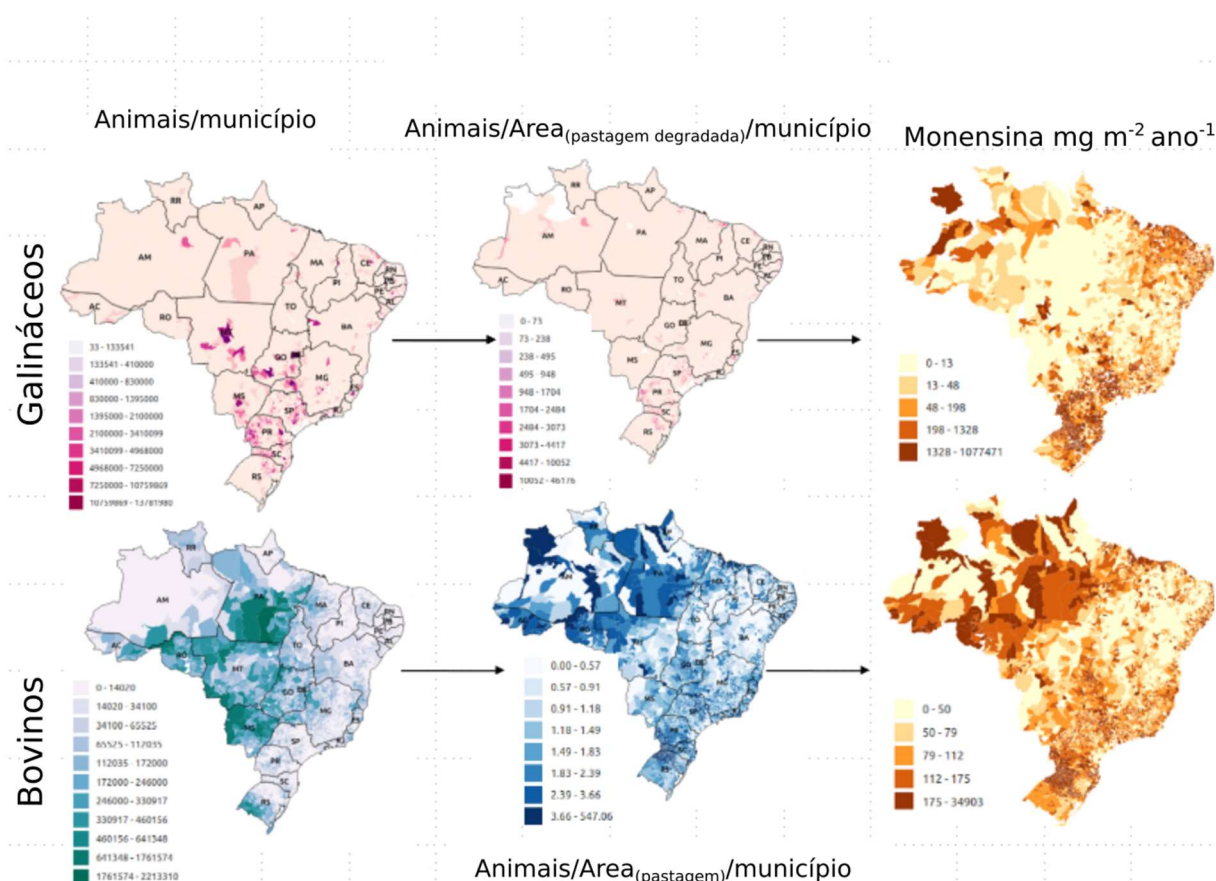


Figura 3: Etapas para a obtenção de mapas de liberação de monensina por unidade de área por município.

2.4 Avaliação do nível de exposição de águas subterrâneas e solos à contaminação

O nível de exposição foi estimado como o potencial do produto veterinário para contaminar o solo e as águas subterrâneas, e foi caracterizado para cada composto conforme o método qualitativo da ISO 15175 (ISO 2011; Torre et al. 2012). Nesta abordagem, o potencial para contaminar o solo (C) é avaliado para cada antibiótico em função de sua taxa de ligação (B) e sua taxa de permanência (P).

O primeiro passo foi classificar o composto de acordo com os valores de limiar segundo a constante de adsorção normalizada pelo conteúdo de carbono orgânico (K_{oc} , g kg⁻¹) e o tempo de eliminação do 90% (DT_{90} , dias). Com o K_{oc} é definido o ranking de ligação e com o DT_{90} é definido o ranking de degradação. Os limiares para

antibióticos foram obtidos da ISO (2011). Assumindo uma cinética de primeira ordem, os valores DT_{90} são obtidos multiplicando DT_{50} por 3,32.

Para a monensina, o composto escolhido como exemplo, que possui um Koc médio de 3783 ($\log Koc = 3,1-3,8$) (Hussain and Prasher 2011), o ranking de ligação seria de 4. O ranking de degradação seria de 5 já que o DT_{90} médio é de 4-6 dias ($DT_{50} = 1,2-1,9$ dias; $DT_{90} = DT_{50} \times 3,32$, conforme reportado por Kolpin et al., 2008)

A taxa ou potencial de ligação (b_0) é obtida de acordo com a matriz de pontuação de ligação ISO. Esta matriz compara os valores de carbono orgânico (%) com o ranking de ligação obtido previamente. O mapa de carbono orgânico ($g\ kg^{-1}$, 0-30 cm) para o Brasil foi obtido da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Com estes dados foi possível obter o mapa de potencial de ligação como mostrado na figura 4. A classificação foi feita no QGIS através do algoritmo *Reclassify values* do SAGA (Conrad et al. 2015). É possível observar que o potencial de ligação está entre 2,5 e 3,0, sendo menor para a região nordeste, devido ao baixo conteúdo de carbono orgânico.

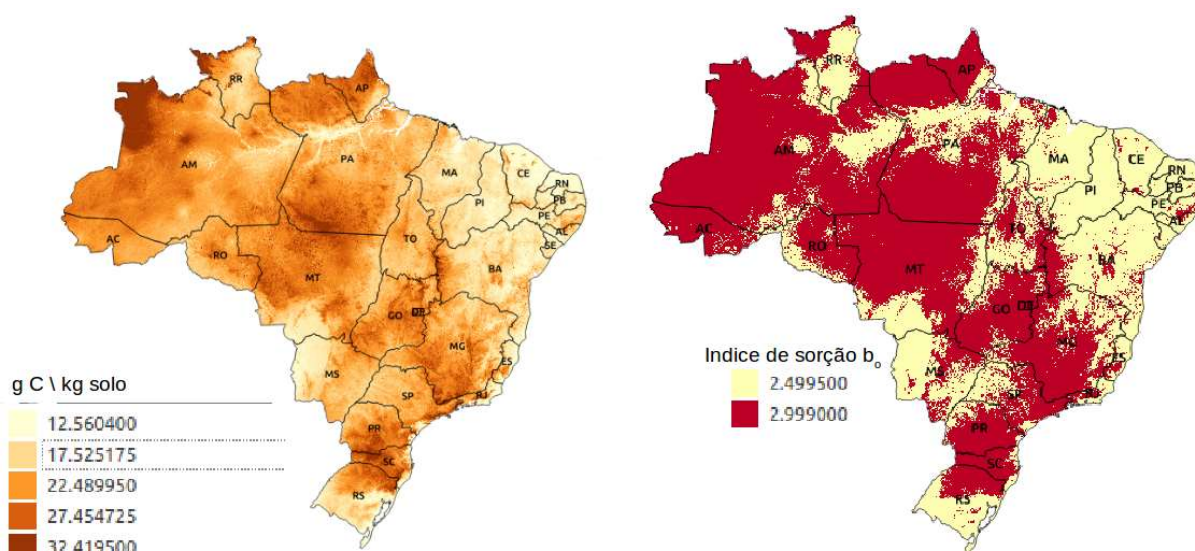


Figura 4: Mapa de potencial de ligação de monensina para o Brasil (direita), obtido a través da classificação dos dados de conteúdo de carbono orgânico modelados pela EMBRAPA (esquerda).

A taxa ou índice de degradação (e_0) foi obtida a partir da matriz de classificação de degradação ISO que combina a temperatura média do solo ($^{\circ}C$) e o valor do ranking de degradação obtido previamente (Torre et al. 2012). Os dados de temperatura média anual foram obtidos do software WorldClim V.1.4 (Hijmans et al. 2005), e foram

classificados da mesma forma que no caso do índice b_0 . O mapa de índice de degradação para monensina no Brasil é apresentado na Figura 5, onde pode ser observados índices menores somente na região sudeste do Brasil.

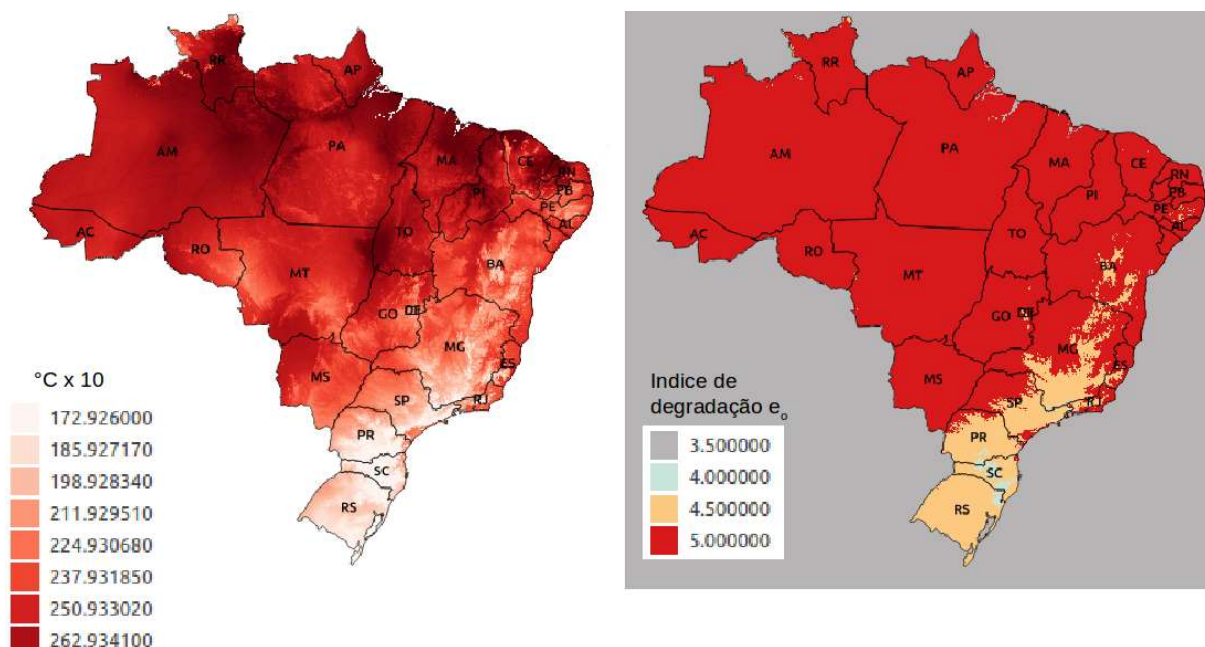


Figura 5: Mapa de potencial de degradação de monensina para o Brasil (direita), obtido a través da classificação dos dados de temperatura média anual obtidos do WorldClim V.1.4 (esquerda).

O terceiro passo consistiu na previsão de lixiviação. Depois de prever a taxa de ligação (b_0) e degradação (e_0) na camada superior do solo (o solo livre de águas subterrâneas), foi realizada uma estimativa da deslocalização do composto e da probabilidade de uma entrada na água subterrânea no subsolo por infiltração. Nesse fim, foi utilizado o balanço hídrico climático e o capacidade de infiltração do solo de acordo com seu tipo. Grades de alta resolução de precipitação mensal e evapotranspiração, para o período 1980-2013, foram obtidas de Xavier et al. (2016). Essas grades foram analisadas com o software net CCDP (NCO) (Zender, 2008). A classificação dos valores de infiltração, de acordo com os valores obtidos da relação $b_0 + e_0 / 2$, foi feita usando o algoritmo *r.reclass* do GRASS (Neteler et al. 2012). Para rasterização e união dos polígonos que foram obtidos no processo, foi necessário o uso de ferramentas adicionais do SAGA e o GDAL (Warmerdam 2008). O resumo gráfico do processo é apresentado na Figura 6. É possível observar que o potencial de lixiviação é alto só em algumas partes do norte do Brasil, em razão das maiores taxas de infiltração nestes lugares.

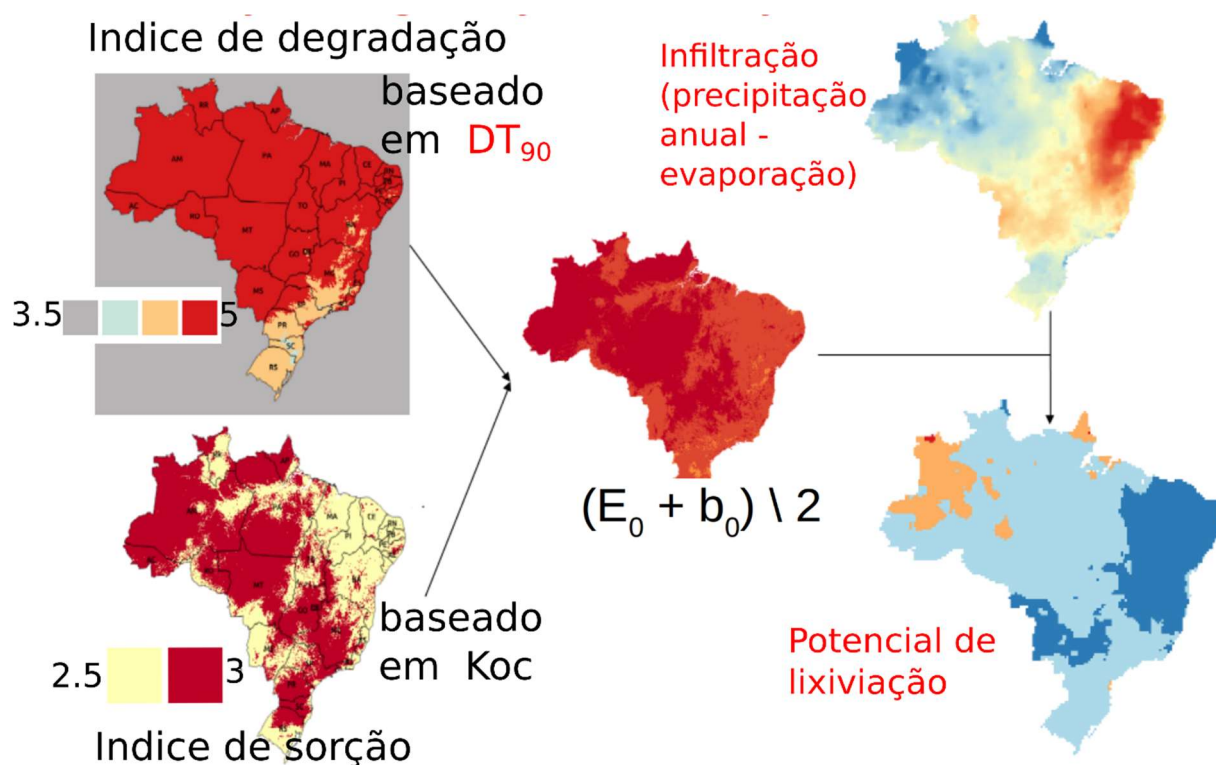


Figura 6: Previsão do potencial de lixiviação de monensina, baseada nos valores de $b_0 + e_0 / 2$ e dos dados de precipitação mensal e evapotranspiração obtidos de Xavier et al. (2016)

A capacidade de infiltração dos solos Brasileiros foi estimada por Sartori et al. (2005). Com estes dados foi possível classificar, numa escala de 1-5, o mapa de classes de solos da Embrapa conforme mostrado na Figura 7. Com a capacidade de infiltração e o potencial de lixiviação baseado no balanço hídrico, foi possível obter os mapas de exposição de águas subterrâneas e solos à contaminação por monensina conforme mostrado na Figura 8.

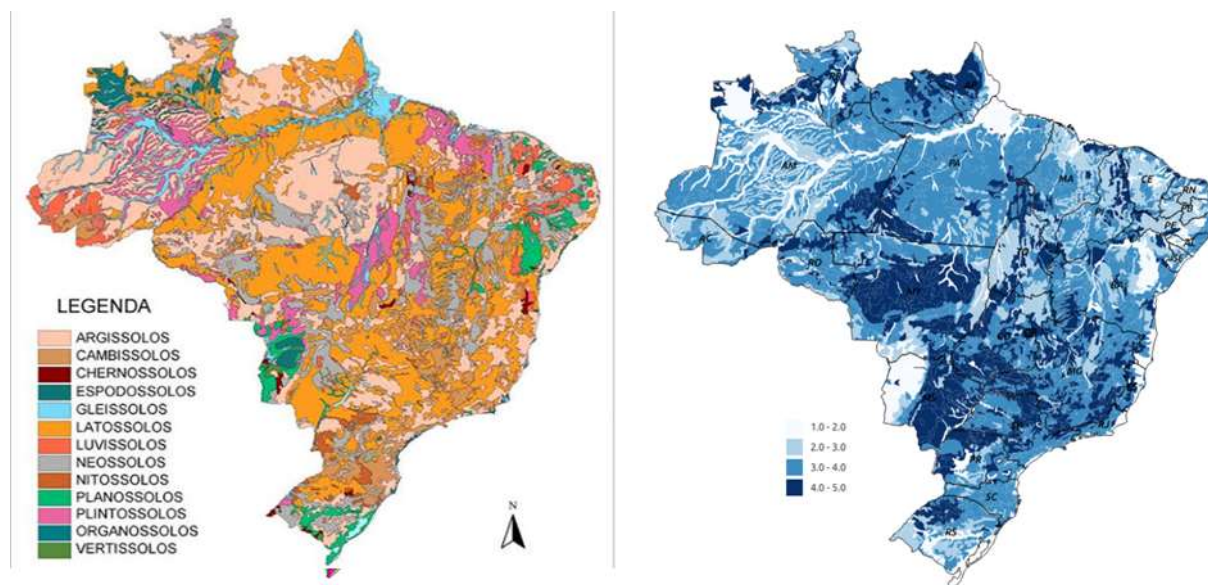


Figura 7: Classificação das classes de solos da Embrapa (esquerda) de acordo com sua capacidade de infiltração conforme Sartori et al. (2005) (direita).

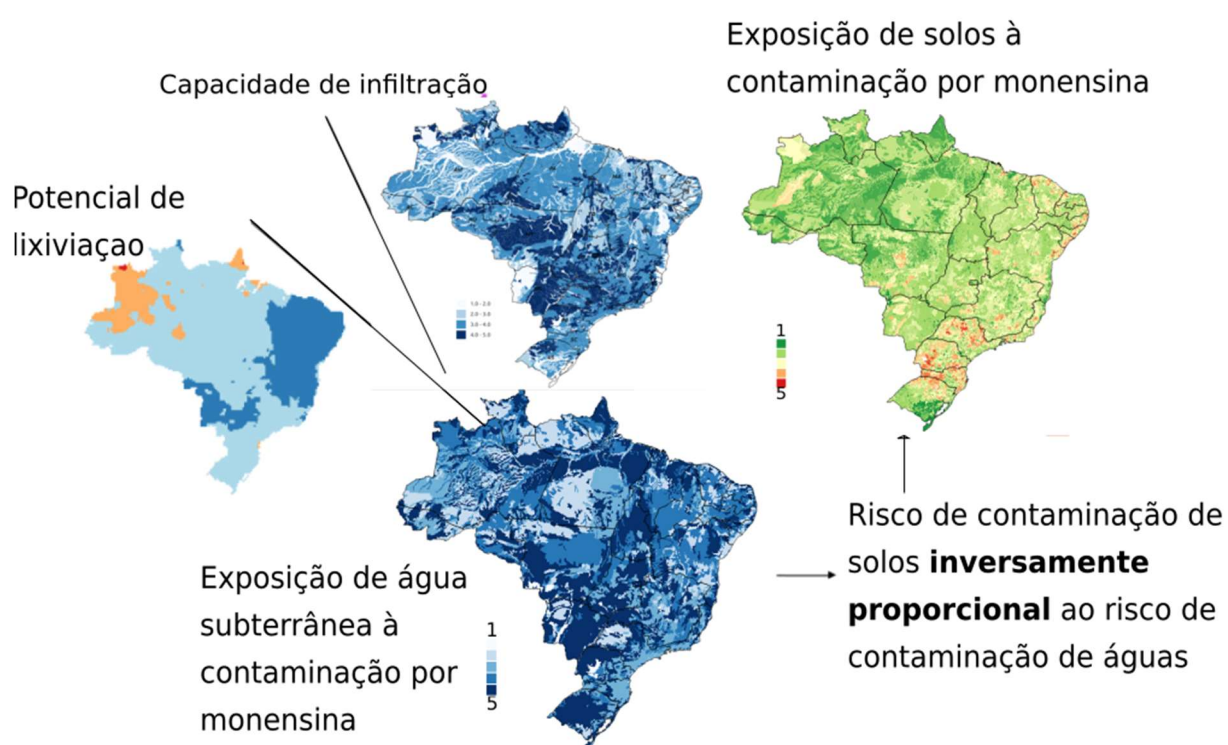


Figura 8: Risco de exposição de águas subterrâneas e solos à contaminação por monensina, conforme norma ISO 15175.

2.5 Avaliação das consequências

A avaliação de consequências visa identificar as áreas onde poderia haver mais exposição ao fármaco veterinário. Assim, os usos do solo do IBGE foram classificados para fornecer aos solos agrícolas e pastagens um maior valor de risco (Torre et al., 2012). A tabela 1 apresenta os coeficientes atribuídos e a Figura 9 mostra o mapa de usos de solo classificados na escala 1-5. O valor aumenta na direção sudeste, o que pode ser atribuído à maior atividade agroindustrial e pecuária desta região em relação ao resto do Brasil.

Tabela 1: Classificação dos usos do solo do IBGE

| Atividade | Coeficiente |
|--|-------------|
| Silvicultura | 1 |
| Área descoberta | 1 |
| Vegetação florestal | 2 |
| Área artificial | 2 |
| Vegetação campestre | 2 |
| Corpo de água continental | 2 |
| Mosaico de vegetação silvestre com áreas agrícolas | 3 |
| Mosaico de vegetação florestal com áreas agrícolas | 3 |
| Pastagem natural | 4 |
| Pastagem plantada | 4 |
| Mosaico de agropecuária com remanescentes florestais | 5 |
| Área agrícola | 5 |

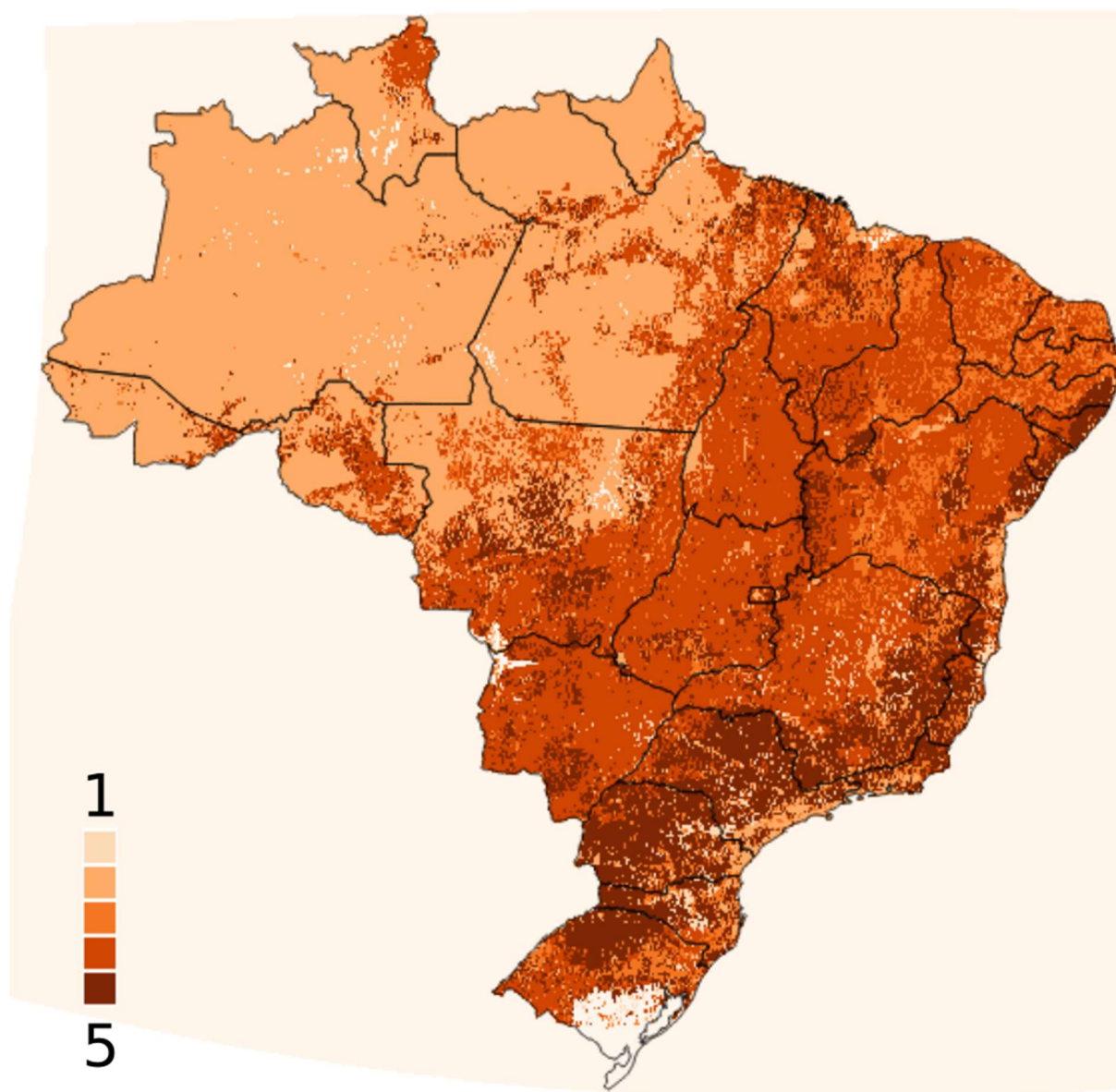


Figura 9: Classificação dos usos do solo do IBGE com o fim de identificar as áreas onde poderia haver mais exposição ao fármaco veterinário.

2.6 Mapas de risco

Após a obtenção dos mapas normalizados de liberação, exposição e consequências, foi calculado o risco como a média dos três mapas. Neste modelo aditivo, o peso dos fatores foi o mesmo (0,333). O mapa final foi cortado pelo mapa de polígonos que define todas as áreas de pastagem (LAPIG, 2018). O produto final deste estudo é apresentado nas figuras 10 e 11 e mostra que o risco de contaminação

é maior para as águas subterrâneas do que para o solo e que as regiões centro-oeste, sul e sudeste do país concentram as áreas mais vulneráveis ou potencialmente poluídas. Este conjunto de dados georeferenciados, na escala 1:5'000.000 é adequado para fins exploratórios, servindo como base para o desenvolvimento de modelos mais complexos no futuro.

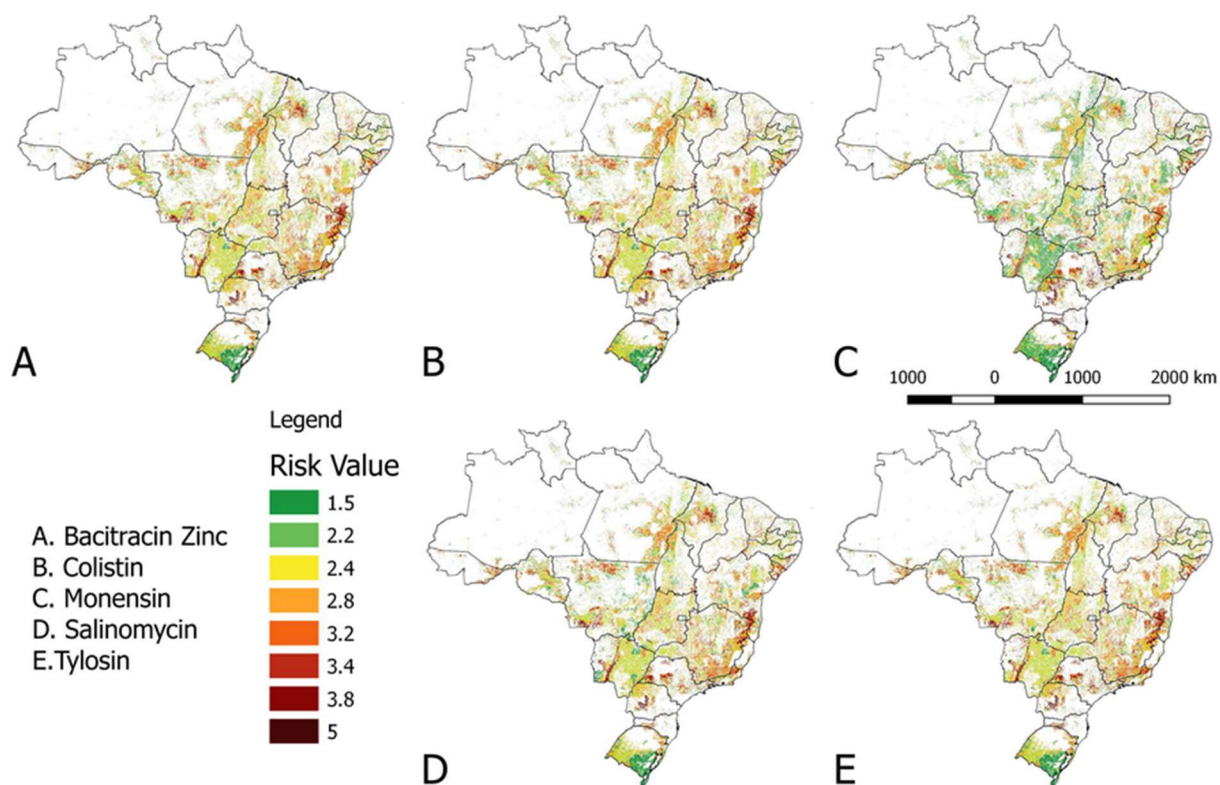


Figura 10: Mapas coropléticos da vulnerabilidade à poluição de solos pelos compostos estudados; as áreas brancas indicam as regiões com vulnerabilidade zero.

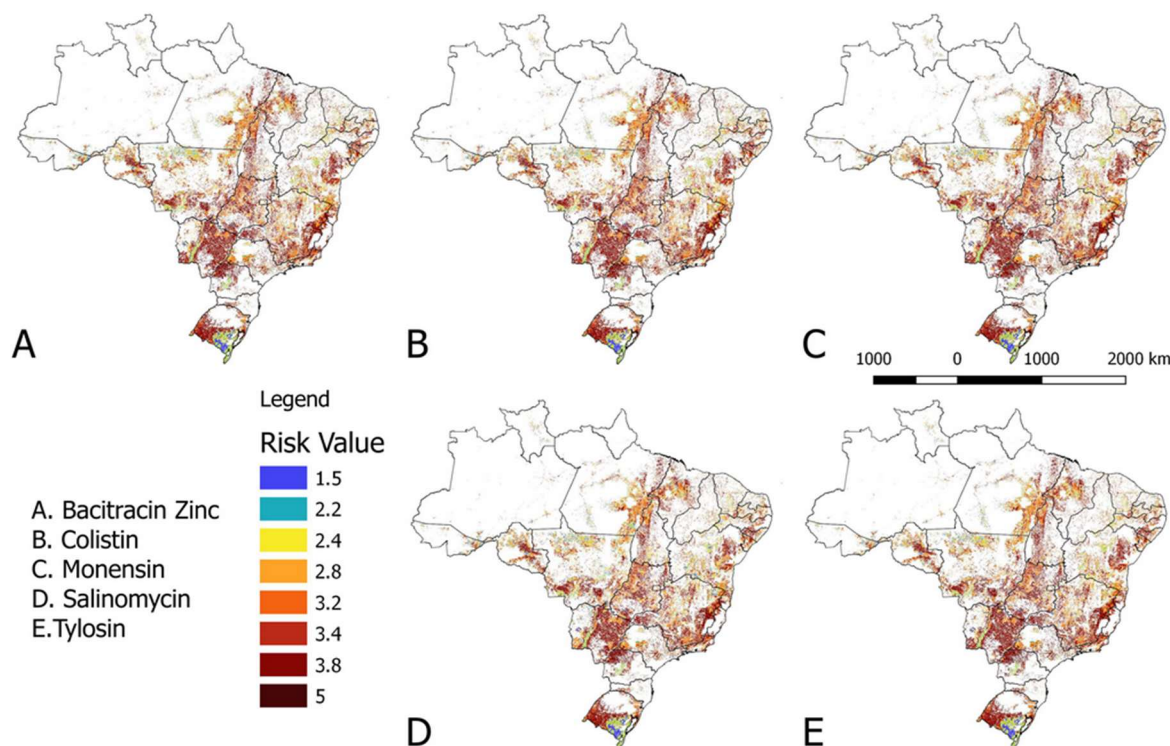


Figura 11: Mapas cloropléticos da vulnerabilidade à poluição da água subterrânea pelos compostos estudados; as áreas brancas indicam as regiões com vulnerabilidade zero.

A extensão das áreas que apresentam vulnerabilidade à contaminação mostram um cenário preocupante para o Brasil, levando em conta que os efeitos negativos destes compostos já estão documentados. Por esta razão, por exemplo, a União Europeia proibiu o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento a partir de 1 de janeiro de 2006 com o Regulamento (EC) No 1831/2003. No Brasil, somente em novembro de 2016, o uso de colistina como promotor de crescimento foi proibido pela Portaria IN nº 45, 22/11/2016, mas com uma implementação gradual da regulamentação. O uso da substância matéria-prima, quando em estoque existente e devidamente importada foi autorizado até 22/11/2017 e o comércio e o uso de produtos manufaturados ou acabados estiveram autorizados até 22/11/2018. No entanto, no momento em que este estudo foi realizado, o uso do produto não tinha ainda nenhuma restrição. Mais recentemente, a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), ligada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou, na Portaria Nº 171, de 13 de dezembro de 2018, a proibição do uso de antimicrobianos promotores de crescimento animal. Nessa, o Art. 1º informa que “o uso dos antimicrobianos tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina

com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos será proibido”. Porém, a portaria não inclui datas específicas para o banimento efetivo. Dessa forma, na lista de aditivos aprovados pelo MAPA para uso na alimentação animal, atualizado em 16/08/2019, ainda aparecem a bacitracina de zinco, a monensina, a tilosina e a salinomicina entre muitos outros antimicrobianos.

2.7 Análise de sensibilidade

Maiores detalhes deste trabalho podem ser encontrados no artigo recentemente publicado e que se encontra anexado à tese (Yopasa-Arenas and Fostier 2018a). O risco foi calculado como um modelo aditivo simples baseado na análise de decisão multicritérios, como proposto anteriormente por Torre et al. (2012):

$$Risco = \frac{(Constante \times densidade animal + Exposição + uso solo)}{3}$$

Como o pH do solo não é homogêneo e que todos os compostos avaliados são ionizáveis, o valor de Koc (constante de partição solo/água normalizada pelo teor de carbono no solo) é diferente para cada valor de pH, pois a espécie química é diferente. No trabalho, foi feita uma ampla aproximação que consiste no uso de um único valor de Koc (médio) para cada composto estudado. Esta aproximação foi considerada válida uma vez que uma análise de sensibilidade mostrou que os fatores que mais influenciam o modelo são os socioeconômicos, como o uso do solo e a densidade de animais, enquanto uma variação de pH teria pouca influência. Esta análise de sensibilidade foi feita no R usando pacotes de geoestatística (rgdal, sp e raster), de ajuste de modelos (fitdistrplus) e de simulação pelo método de Monte-Carlo (mc2d).

A densidade de animais pode ser descrita por uma distribuição de Poisson com o parâmetro: $\lambda = 0.37392 \pm 0.00006$. A constante que descreve o uso de cada composto é descrita por uma distribuição normal com parâmetros: $média = 2,15$ e, desvio padrão (dp) = 2. Os parâmetros de adsorção (b_0) e permanência (e_0) são descritos por uma distribuição uniforme com $mínimo = 0$ e $máximo = 5$. Esta distribuição expressa a complexidade do caso real, onde o Koc depende fortemente da especiação dos compostos ionizáveis, que por sua vez depende do pH do solo. Como valores de Koc para o intervalo de valores de pH Brasileiros não existem, foi

proposto considerar então todos os possíveis valores de Koc e DT₉₀ (90% *Decay Time*), e subsequentemente todos os valores possíveis de e₀ e b₀.

O uso do solo pode ser descrito por uma distribuição de Poisson com parâmetro: $\lambda = 3.83 \pm 0.01$

A infiltração pode ser descrita por uma distribuição normal com $média = 3.62 \pm 0.02$, $dp = 1.13 \pm 0.01$

A exposição é calculada com uma função de crescimento logístico:

$$Exposição = \frac{Infiltração}{1 + e^{-\left(\frac{e_0 + b_0}{2}\right)}}$$

Após a definição do modelo, uma simulação de Monte-Carlo unidimensional foi feita com 1001 iterações. Com a função "tornado" do pacote mc2d foram calculados índices de correlação de Spearman entre as variáveis do objeto de Monte-Carlo. O valor do estatístico rho de Spearman na Figura 12 mostra a influência relativa de cada parâmetro no modelo. O parâmetro estatístico rho mostra a influência relativa de cada parâmetro, mostrando claramente que a adsorção e a permanência dos fármacos no solo (relacionados com Koc e DT₉₀) têm pouco peso no modelo.

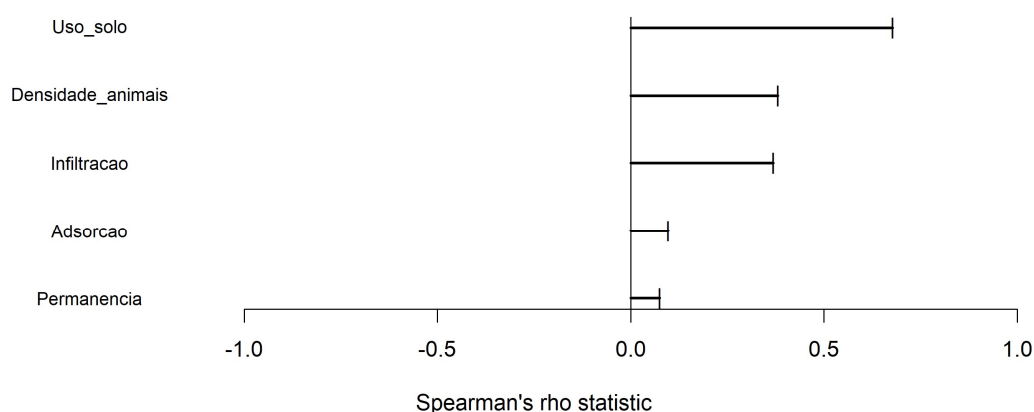


Figura 12: Resultados da análise de sensibilidade.

Todos os arquivos gerados no trabalho, na forma de vetores, matrizes e demais foram juntados para formar um sistema de informação geográfica (SIG). Esta base de

dados foi publicada como *Mendeley data* (Yopasa-Arenas and Fostier 2018b), para seu uso por parte de pesquisadores interessados no assunto.

3 Estudo do processo de cotransporte facilitado pela matéria orgânica dissolvida.

3.1 Introdução

Embora modelos baseados em estudos laboratoriais não permitam descrever de maneira totalmente satisfatória o número e a complexidade dos mecanismos envolvidos no processo de transporte de uma substância química no solo, tais estudos permitem obter informações valiosas sobre a capacidade de mobilidade do produto em estudo. Considerando que até agora a maioria dos estudos relativos à mobilidade de antimicrobianos foram realizados em solos de regiões temperadas, é importante que sejam obtidos dados de mobilidade destes produtos em solos brasileiros que apresentam em muitos casos características/propriedades diferentes. Nos solos Brasileiros, por exemplo, são comuns minerais de carga variável (caulinita, goethita, hematita e gibbsita) (Fontes and Weed 1991; Melo et al. 2001). Nestes solos tropicais, devido às altas temperaturas e à alta precipitação, os solos também estão altamente degradados e o teor de matéria orgânica geralmente é baixo. Essas condições favorecem a ruptura das estruturas minerais primárias e secundárias levando à formação de compostos mais simples, como óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio. As cargas destes compostos são dependentes do pH, e nos solos ácidos brasileiros (IGBP-DIS 1998), a capacidade de troca aniônica pode ultrapassar a capacidade de troca de catiônica (Fontes and Alleoni 2006). Do estudo inicial de análise de risco ficou claro que o fármaco-poluenente entra no solo na maioria dos casos por meio das fezes de animais medicados, sendo imprescindível o estudo do processo de transporte do fármaco *junto* com o material orgânico originária das fezes. Observações recentes em escala de campo e em laboratório mostraram que na presença de partículas coloidais móveis (micróbios, substâncias húmicas, argilas e óxidos metálicos entre outros), os coloides podem atuar como transportadores de poluentes e, assim, fornecer uma via rápida de transporte para poluentes fortemente retidos no solo (Šimůnek et al. 2006; Zou and Zheng 2013; Chabauty et al. 2016; Zhou et al. 2016). Este tipo de sistemas é ainda pouco estudado devido à complexidade da matéria orgânica natural e em razão

do número ainda limitado de técnicas analíticas e numéricas que permitem a obtenção e análise de curvas de ruptura nestas matrizes ambientais. O objetivo principal desta parte da tese foi, portanto, desenvolver os métodos analíticos necessários para a determinação de fármacos num sistema multi-matrizes (solo, coloides de cama de frango, água) e assim estudar se existe cotransporte e sua magnitude na escala correspondente a colunas de solo saturadas.

Para esta parte do trabalho não foram estudados os representantes dos anticoccidianos e promotores de crescimento (bacitracina de zinco, monensina, salinomina, colistina e tilosina), pois, embora o trabalho inicial mostrou sua importância e o risco de poluição potencial que representam, estudos de sorção e transporte destes compostos ainda não foram desenvolvidos no Brasil. Para o estudo de cotransporte foram então escolhidas as fluoroquinolonas: enrofloxacin (ENRO) e seu principal produto de transformação, a ciprofloxacina (CIPRO). Estes compostos são amplamente usados como agentes terapêuticos no Brasil e sua sorção e alguns dos seus mecanismos de interação com a matéria orgânica já foram estudados nos mesmos solos que aqueles escolhidos para o presente trabalho (Leal et al. 2012; Peruchi et al. 2015; Martínez-Mejía et al. 2017; Rath et al. 2019). Estes dados prévios são valiosos e importantes para modelar o processo de transporte, que é o objeto final do trabalho.

A ENRO e a CIPRO foram escolhidas neste trabalho precisamente por apresentar coeficientes de sorção especialmente altos quando comparados com outros fármacos nos solos estudados: um latossolo vermelho amarelo distrófico-LVAd (K_D (L Kg⁻¹) = 2128 para ENRO e 2879 para CIPRO) e um neossolo quartzarênico órtico-RQo (K_D = 780 para ENRO e 1103 para CIPRO) (Leal et al. 2012). Estes valores representam aproximadamente entre 9% e 23% do valor do K_D de um fármaco de estrutura similar, a norfloxacina (NOR) nos ácidos húmicos extraídos dos mesmos solos (K_D = 12650 para LVAd e 8674 para RQo) (Martínez-Mejía et al. 2017). Ou seja, se assumimos que o ácido húmico é representante principal da matéria orgânica (MO) (Masoom et al. 2016), é possível estabelecer como hipótese que o transporte do fármaco está governado pelo transporte da matéria orgânica no solo, pois, a princípio, a afinidade do composto é aproximadamente de 5 a 10 vezes maior para a MO do que para o solo. Porém, conforme apresentado de maneira simplificada na figura 15, o processo de cotransporte é bem mais complexo. Sendo assim, o transporte de compostos em

solos dificilmente pode ser predito por meio dos coeficientes de sorção. Para o estudo deste sistema foi, portanto, proposto o uso do módulo C-RIDE do software HYDRUS-1D (Šimůnek et al. 2015), um modelo numérico que incorpora mecanismos associados ao coloide e o transporte facilitado por coloides em meios porosos com saturação de água variável.

Um experimento de transporte que tente simular uma situação real exige a mistura das diferentes matrizes. Por esta razão foi proposto um experimento em que o fármaco é adicionado às colunas de solo por meio de porções de cama de frango enriquecidas com o padrão de fármaco. Foi assim necessário desenvolver um método de extração e limpeza dos fármacos presentes em amostras complexas, como são o solo e a cama de frango (mistura de fezes e materiais absorventes como serragem e casca de arroz).

Por lixiviação, componentes da cama de frango, principalmente componentes da matéria orgânica (MOD_{cama}), vão ser transportados ao longo da coluna. Logo é um caso de cotransporte em que parte da matriz de solo está misturada com parte da matriz da cama de frango. Quando se quer avaliar o lixiviado da coluna (eluato), tem que se levar em conta que existe uma solução complexa de MOD_{solo} (principalmente ácidos húmicos e fúlvicos), MOD_{cama} (principalmente proteínas), o analito, e outros (como íons solúveis e outros).

Devido à complexidade do sistema e ao grande número de amostras a serem analisadas (cama + solo + lixiviados), foi necessário escolher um método simples, rápido e confiável com grande capacidade de amostragem. Para esta finalidade foi proposto o método QuEChERS (do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). O método tem as vantagens que o nome indica: é rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Este método possui uma etapa de extração com solvente (geralmente acetonitrila) facilitada pelo efeito *salting-out* ou *freezing-out*, seguida de uma etapa de limpeza por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE). Foi desenvolvido inicialmente para a análise múlti-resíduo de pesticidas em alimentos, mas, devido à simplicidade, baixo custo, versatilidade, e a alta capacidade de amostragem, várias modificações foram propostas para estender o número de compostos estudados e o número de matrizes analisadas. Estão reportados métodos baseados em QuEChERS em amostras biológicas e em solos (Vera et al. 2013). No solo já foram estudados compostos distintos dos pesticidas, como fármacos de uso

humano e veterinário incluindo antimicrobianos (Salvia et al. 2012; Bragança et al. 2012).

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Caracterização dos solos estudados

Dois tipos de solos foram empregados no estudo: um solo do tipo Latossolo Vermelho-amarelo distrófico (LVAd) e um Neossolo Quartzarênico órtico (RQo) conforme nomenclatura do sistema brasileiro de classificação de solos (EMBRAPA 2013). O LVAd apresenta textura argiloarenosa e o RQo uma textura arenosa, conforme a classificação da USDA (USDA 2017). As amostras foram coletadas no estado de São Paulo, o LVAd na Fazenda Santa Elisa, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas (22°51'28"S e 47°05'56"O), e o solo RQo no município de Piracicaba (22°33'44"S e 47°53'34"O). As amostras de solo foram coletadas numa profundidade de 0 a 20 cm, peneiradas sobre malha de 2 mm e secas a temperatura ambiente. As propriedades físico-químicas dos solos foram determinadas no IAC e são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos solos estudados

| Variável | Método | Unidade | LVAd | RQo |
|----------|--|-----------------------|------|-----|
| pH | CaCl ₂ 0,01 mol L ⁻¹ | NA | 4,4 | 4,0 |
| MO | Colorimétrico | g L ⁻¹ | 34 | 13 |
| P | Resina | mg L ⁻¹ | 8 | 3 |
| K | Resina | mmolc L ⁻¹ | 1,1 | 0,1 |
| Ca | Resina | mmolc L ⁻¹ | 13 | 1 |
| Mg | Resina | mmolc L ⁻¹ | 5 | 0 |
| Na | CH ₃ COONH ₄ pH 7 | mmolc L ⁻¹ | 0,1 | 0,1 |

| | | | | |
|---|--|--------------------------------|--------------------------|---------|
| Al trocável | KCl 1mol L ⁻¹ | mmolc L ⁻¹ | 2 | 5 |
| Al+H trocável | Tampão SMP | mmolc L ⁻¹ | 46 | 23 |
| Soma de bases | Calculado | mmolc L ⁻¹ | 19,2 | 1,2 |
| CEC | Calculado | mmolc L ⁻¹ | 65,2 | 24,2 |
| Saturação de bases | Calculado | % | 29 | 5 |
| S como SO ₄ ²⁻ | Ca(H ₂ PO ₄) ₂ | mg L ⁻¹ | 6 | 3 |
| B | Água quente | mg L ⁻¹ | 0,28 | 0,11 |
| Cu | DTPA pH 7,3 | mg L ⁻¹ | 4,3 | 0,3 |
| Fe | DTPA pH 7,3 | mg L ⁻¹ | 47 | 53 |
| Mn | DTPA pH 7,3 | mg L ⁻¹ | 7,6 | 1,1 |
| Zn | DTPA pH 7,3 | mg L ⁻¹ | 1,5 | 0,7 |
| Areia | Pipeta/hidrómetro | % | 50,9 | 93,2 |
| Silte | Pipeta/hidrómetro | % | 8,2 | 1,5 |
| Argila | Pipeta/hidrómetro | % | 40,9 | 5,1 |
| Textura | USDA | NA | Argilo so- arenoso | Arenoso |
| Área superficial | BET | m ² g ⁻¹ | 47,22 1 | 28,882 |
| Densidade real | Picnómetro de He | g cm ⁻³ | 2,661 4 | 2,6956 |
| Porosidade | Calculado | NA | 0,66 | 0,55 |

3.2.2 Desenho da coluna e empacotamento do solo

Em todo o trabalho foram utilizadas colunas de vidro empacotadas com solo em condição de saturação de água, de 30 cm de comprimento x 4 cm de diâmetro interno. Esta configuração das colunas foi escolhida com a finalidade de harmonizar o trabalho com as recomendações para estudos de lixiviação da USEPA (USEPA 2008) - recomendações harmonizadas por sua vez com o método OCDE 312 (OECD 2004) - para ensaios de lixiviação de produtos químicos em colunas de solo. A razão diâmetro/altura da coluna de pelo menos 1/4 evita efeitos das paredes da coluna sobre o fluxo (Lewis and Sjöström 2010). Para garantir o fluxo unidimensional na coluna foram adicionadas duas zonas defletoras ou linearizadoras de fluxo de 2 cm, no topo e no fundo da coluna, feitas de lã de vidro (Barry 2009), conforme apresentado na figura 13. Para o empacotamento, foram depositadas pequenas quantidades de solo umedecido na coluna cheia de água com agitação, conforme Oliviera et al. (1996). Esta técnica permite uma alta densidade com empacotamento uniforme sem causar nenhuma segregação lateral por tamanho de partícula. As colunas foram equilibradas com NaNO_3 $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ na velocidade de $0,09 \text{ cm min}^{-1}$ por pelo menos 48 h.

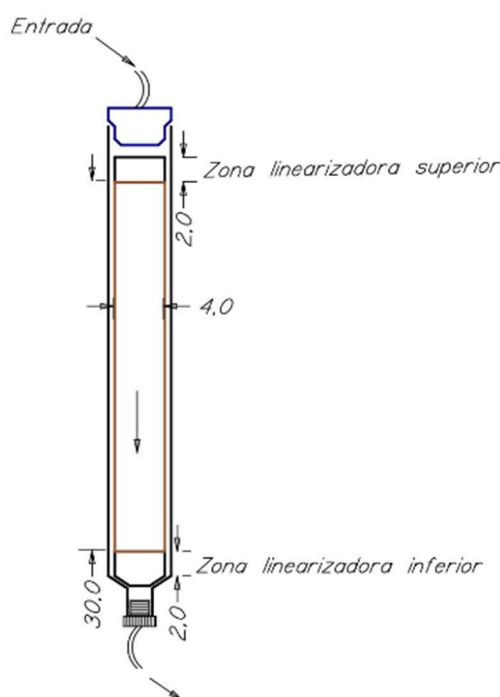


Figura 13: Representação gráfica da coluna de solo utilizada nos experimentos, com as duas zonas linearizadoras de fluxo que permitem satisfazer os requisitos de fluxo uniforme.

Para facilitar a coleta, foi desenvolvido um coletor de amostras automatizado, composto por um motor de passo kiatronics modelo 28BYJ-48 e um micro servo TowerPro SG90, ambos controlados pela placa de microcontrolador Arduino UNO R3 e o driver para motores MotorShield L239D da Adafruit Industries (Figura 14). Este dispositivo coleta amostras de volumes variáveis em tempos igualmente variáveis sem interrupção.

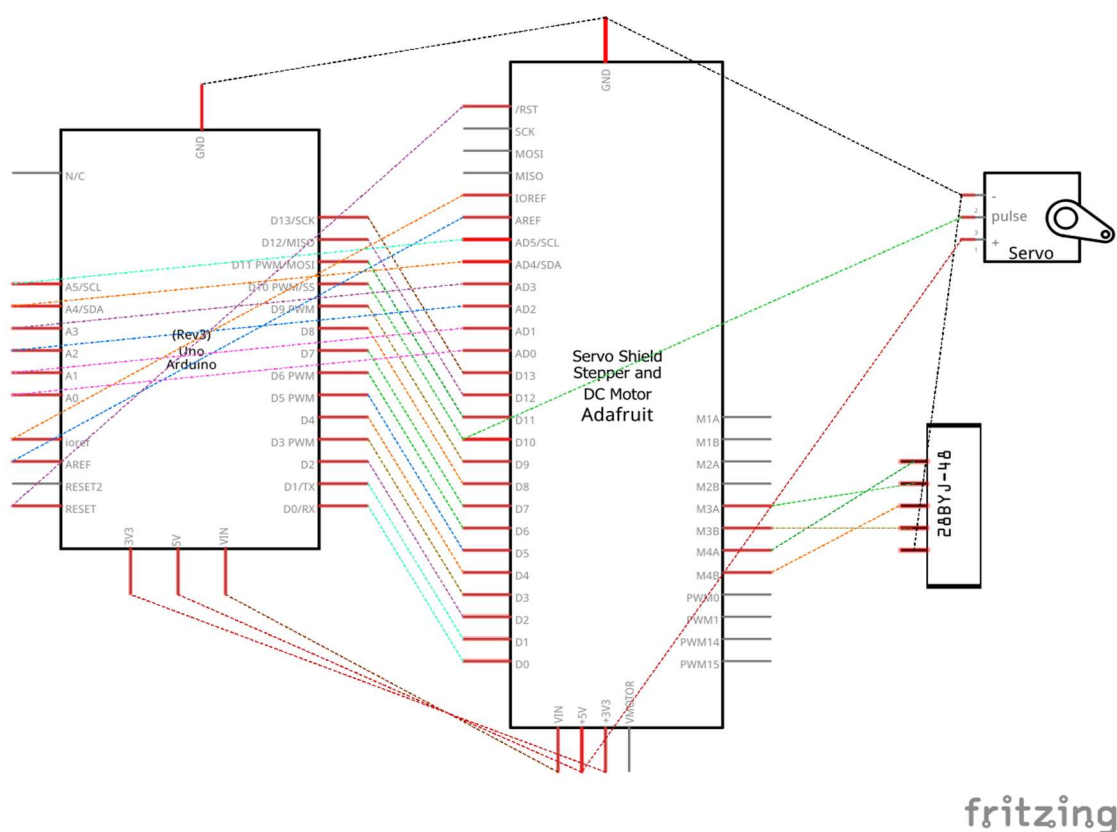


Figura 14: Esquema do coletor de amostra desenvolvido no laboratório.

3.2.3 Modelo

O modelo escolhido, descrito por Šimůnek et al. (2015), assume que os colóides existem em três estados: móveis ou suspensos em água (C_c , $[\text{nL}^{-3}]$), retidos na fase sólida (S_c^{att} , S_{c1} , $[\text{nM}^{-1}]$) ou incluídos (retidos fisicamente) na fase sólida (S_c^{str} , S_{c2} , $[\text{nM}^{-1}]$), (sendo L unidade de comprimento, M unidade de massa e n o número de colóides). O poluente pode estar dissolvido na fase aquosa, ou pode estar sorvido instantaneamente e cineticamente à fase sólida e aos colóides em todos seus

estados. Sendo assim, considera-se o poluente em pelo menos 6 estados: dissolvido (C , $[ML^{-3}]$), sorvido instantaneamente (S_e , $[MM^{-1}]$) ou cineticamente à fase sólida (S_k , $[MM^{-1}]$) e sorvido em coloides móveis (S_{mc} , $[Mn^{-1}]$) ou imóveis [sendo estes retidos quimicamente (S_{ic1} , $[Mn^{-1}]$) ou fisicamente (S_{ic2} , $[Mn^{-1}]$) na fase sólida], conforme esquematizado na figura 15. Os coeficientes k na figura representam taxas de primeira ordem de sorção/dessorção, os coeficientes K_d e ω representam respectivamente a sorção do soluto instantânea ou cinética à fase sólida enquanto que os fatores Ψ dão conta das não-linearidades dos processos.

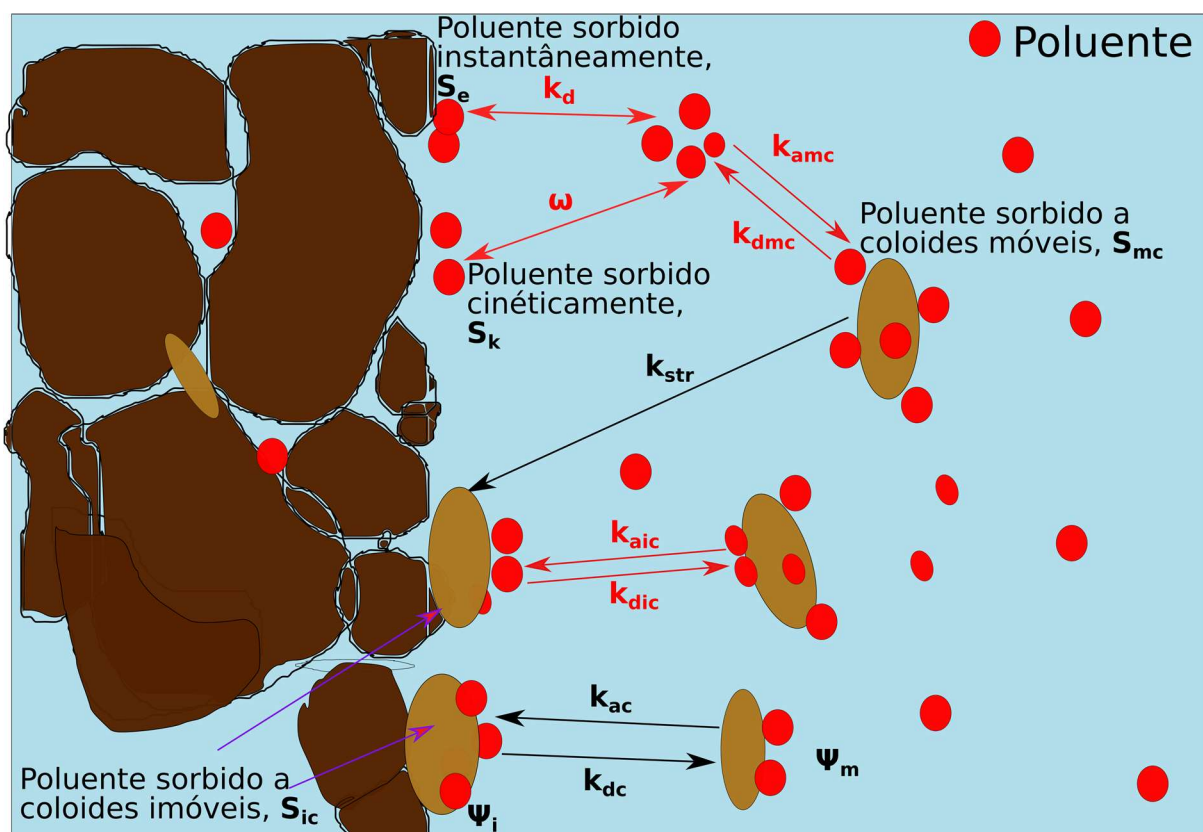


Figura 15: Esquema do modelo de transporte de soluto facilitado por coloides. O significado dos diferentes parâmetros está explicado no texto

Por conveniência numérica, o transporte do coloide e o processo de transporte de soluto facilitado por coloide é simulado através de equações de transporte e de transferência de massa de três espécies diferentes (Šimůnek et al. 2006; Šimůnek et al. 2015): coloides, soluto associado aos coloides e soluto. O processo de transporte do coloide ocorre em condições de não equilíbrio, pois envolve processos cinéticos de sorção/dessorção, e pode ser também não linear quando se consideram funções

de bloqueio em processos de sorção química e física (*straining*), o que geralmente se aplica pois os coloides apresentam propriedades físicas tais como plasticidade, coesão, dispersão e floculação. O mesmo se aplica também para o soluto associado ao coloide, pois pode se assumir que esta espécie se comporta como um coloide. Finalmente, o processo de transporte de soluto pode se dar em condições de não equilíbrio por ocorrer sorção/dessorção cinética em modelos de dois-sítios (ou de água móvel/imóvel), e também pode ser não linear considerando isothermas de Freundlich ou Langmuir.

3.2.3.1 Coloides

Equação para o transporte de coloides

$$\frac{\partial \theta_c C_c}{\partial t} + \rho \frac{\partial S_{c1}}{\partial t} + \rho \frac{\partial S_{c2}}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(\theta D^c \frac{\partial C_c}{\partial x} \right) - \frac{\partial q_c C_s}{\partial x} - \mu_{cw} \theta C_c - \mu_{cs} \rho C_c$$

Sendo

C_s a concentração do coloide na fase líquida [nL^{-3}]. S_c é a concentração do coloide na fase sólida [nM^{-1}]. θ_c é o conteúdo de água accesível aos coloides [L^3L^{-3}], que é geralmente menor que o conteúdo total de água θ . ρ é a densidade aparente [ML^{-3}]. q_c é o fluxo Darcyano [LT^{-1}]. D^c é o coeficiente de dispersão [L^2t^{-1}]. t é o tempo [T], μ_{cw} é o decréscimo do coloide na fase líquida e μ_{cs} é o decréscimo na fase sólida [T^{-1}].

Transferência de massa do coloide

A transferência de massa do coloide entre a fase sólida e a líquida é descrita tradicionalmente (Šimůnek et al. 2015) usando modelos de deposição-desprendimento do tipo:

$$\rho \frac{\partial S_{c1}}{\partial t} = \theta_c \psi_c k_{ac} C_s - \rho K k_{dc} S_{c1} - \mu_{cs} \rho S_{c1}$$

Sendo, k_{ac} o coeficiente de deposição [T^{-1}], k_{dc} o coeficiente de desprendimento [T^{-1}] e ψ_c e uma função adimensional de retenção do coloide ou um coeficiente de bloqueio.

3.2.3.2 Solute associado a coloides

Equação de transporte

A equação de transporte para o soluto associado ao coloide é dada por:

$$\begin{aligned} & \frac{\partial \theta_c C_c S_{mc}}{\partial t} + \rho \frac{\partial S_c S_{ic}}{\partial t} \\ = & \frac{\partial}{\partial x} \left(\theta_c D^2 \frac{\partial C_c S_{mc}}{\partial x} \right) - \frac{\partial q C_c S_{mc}}{\partial x} - \theta_c K_{dmc} C_c S_{mc} - \rho k_{dic} S_c S_{ic} + \theta k_{amc} \psi_m C + \theta k_{aic} \psi_{im} C \\ & - R_{s3} \end{aligned}$$

Sendo, k_{dmc} o coeficiente da taxa de dessorção de coloides móveis [T^{-1}], k_{dic} é o coeficiente da taxa de dessorção de coloides imóveis [T^{-1}], k_{amc} e k_{aic} são os coeficientes da taxa de adsorção de solutos a coloides móveis e imóveis, respectivamente [T^{-1}]. ψ_m é um parâmetro que ajusta a taxa de sorção ao número de coloides móveis presentes. C_c^{ref} é a concentração de coloides móveis de referência para a qual a taxa de sorção k_{amc} é válida [ML^{-3}]. ψ_i é um parâmetro que ajusta a taxa de sorção ao número de coloides imóveis presentes. S_c^{ref} é a concentração de coloides imóveis de referência para a qual a taxa de sorção k_{aic} é válida [-] (-: adimensional). R_{s2} é um termo que da conta das reações de degradação do poluente dissolvido e sorvido à fase sólida [$ML^{-3}T^{-1}$] e R_{s3} é um termo que da conta das reações de degradação do poluente sorvido aos coloides [$ML^{-3}T^{-1}$].

Equação de transferência de massa (adimensional)

A equação de transferência de massa para o contaminante sorvido nos coloides imóveis pode ser definida como:

$$\rho \frac{\partial S_c S_{ic}}{\partial t} = \theta \psi_c K_{ac} C_c S_{mc} - \rho k_{dc} S_c S_{ic} + \theta k_{aic} \psi_{im} C - \mu_i \rho S_c S_{ic}$$

Todos os termos foram definidos acima.

3.2.3.3 Soluto

Equação de transporte

$$\begin{aligned} & \frac{\partial \theta C}{\partial t} + \rho \frac{\partial S_e}{\partial t} + \rho \frac{\partial S_k}{\partial t} \\ &= \frac{\partial}{\partial x} \left(\theta D \frac{\partial C}{\partial x} \right) - \frac{\partial q C}{\partial x} - \theta K_{amc} \psi_m C - \theta K_{imc} \psi_{im} C + \theta_c K_{dmc} C_c S_{imc} + \rho k_{dic} S_c S_{ic} - R_{s2} \end{aligned}$$

Equação de transferência de massa

Pode ser usado o conceito de sorção em dois sítios assumindo que a sorção total, S , pode ser dividida em duas frações:

$$S = S_e + S_k$$

Onde a sorção S_e ocorre instantaneamente na fração de sítios de tipo 1 [MM⁻¹], e a sorção S_k ocorre no resto dos sítios de tipo 2 de forma dependente do tempo de acordo com:

$$\rho \frac{\partial S_k}{\partial t} = \omega [(1 - f) \Psi(C) - S_k] - \mu_s S_k$$

Onde, ω é a constante de velocidade de primeira ordem [T⁻¹], f é a fração de sítios de intercâmbio, assumindo que estão em equilíbrio com a fase líquida [-], $\Psi(C)$ é a isoterma de adsorção [MM⁻¹] que pode ser expressa usando modelos de Freundlich, de Langmuir, mistos ou de adsorção linear.

O desenvolvimento destas equações leva à necessidade da introdução/definição no modulo c-ride de aproximadamente 45 parâmetros, podendo-se dividir estes entre parâmetros físicos (que definem o transporte da água no meio poroso) e químicos (que estudam o processo de interação/partição coloide-soluto-solo-água); detalhes técnicos podem ser consultados em Šimůnek et al. (2008). Devido à dificuldade de propor *a-priori* valores para tantos parâmetros faz-se necessário a realização de experimentos de transporte, bem como a modelagem dos dados assim obtidos por meio de métodos de otimização inversa. Os experimentos podem ser divididos em três etapas:

- a) Estudo de transporte da água com o uso de um traçador conservativo
- b) Estudo de transporte da matéria orgânica dissolvida

c) Estudo de transporte do fármaco.

3.2.4 Estudo de transporte da água com o uso de um traçador conservativo

Neste trabalho procurou-se modelar os dados experimentais e os primeiros passos foram o estudo da matéria orgânica e de um traçador conservativo. Um traçador conservativo é um material que apresenta transporte não-reativo e que não possui interação forte com os sólidos do sistema. Nesse caso, os parâmetros de transporte a serem obtidos são o coeficiente de dispersão hidrodinâmica e o coeficiente de difusão molecular. Nas vazões utilizadas neste trabalho, o coeficiente de difusão molecular pode ser desprezado e os parâmetros de transporte são reduzidos ao coeficiente de dispersão hidrodinâmica. Este parâmetro é a base para o estudo de sistemas reativos, como é o caso do sistema de transporte de fármacos por cotransporte com colóides da matéria orgânica.

Para os solos usados neste trabalho, o uso de traçadores típicos como os sais de cloreto e brometo mostrou-se inaplicável devido às interações destes ânions com a matriz sólida. Em trabalho prévio do grupo (Yopasa Arenas et al. 2018) concluiu-se que estes ânions apresentam adsorção não linear e exclusão aniônica devido à adsorção em óxidos de ferro e alumínio, caulinita e montmorillonita. Nesse trabalho prévio, foi então proposto o uso de nanopartículas de prata recobertas com polivinilpirrolidona (PVP-AgNP) como traçador conservativo.

Para a obtenção das curvas de ruptura (caracterização da concentração em função do tempo), os solos argilo-arenoso (LVAd) ou arenoso (RQo) foram empacotados em colunas de vidro de 30 cm de comprimento x 4 cm de diâmetro interno. As colunas foram preparadas de modo a obter uma condutividade hidráulica saturada (K_{sat}) de $5,4 \text{ cm h}^{-1}$, sem diferenças significativas entre solos de diferente composição ($p < 0,05$). Experimentos realizados em colunas que possuem condutividades hidráulicas similares são mais fáceis de serem comparados e analisados, permitindo aprofundar o entendimento dos aspectos físico-químicos do fenômeno de transporte, como são as interações químicas entre solutos e componentes da fase sólida do solo.

Todas as colunas foram saturadas com NaNO_3 $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ na velocidade de $0,09 \text{ cm min}^{-1}$ por 48 h. Depois de equilibrada a vazão, foi percolado um volume de poro de dispersão de PVP-AgNP de diâmetro de 25 nm com concentração $5,0 \text{ mg Ag L}^{-1}$. Foi monitorada a absorbância a 398 nm a cada 6 min por 225 min e a curva de ruptura foi assim obtida assumindo $C/\text{Co} = A/\text{Ao}$ (Lei de Beer) conforme Yopasa Arenas et al. (2018).

3.2.5 Estudo de transporte da matéria orgânica de cama de frango

3.2.5.1 Amostras de cama de frango

Trinta frangos foram criados em uma área cercada de 12 m^2 e coberta por 300 litros de casca de arroz, obtendo-se um leito de aproximadamente 10 cm de altura. Foram administrados, por via oral através do consumo de água, $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de Enrofloxacin (Flotril 10%, Schering-Plough) por 4 dias. Em cada dia de amostragem, a cama foi amostrada até 10 cm de profundidade, em 6 pontos distribuídos regularmente dentro do cercado. As seis amostras foram colocadas no mesmo saco plástico para formar uma amostra composta. As amostras foram coletadas imediatamente antes do início (A1) e logo após o final (A2) do tratamento. Após o término do tratamento, os frangos permaneceram no bloco por um período de 7 dias (período de carência de antibiótico) e uma nova amostragem de leito foi realizada ao final desse período (A3). No mesmo dia, os animais foram retirados do cercado e uma nova amostragem foi realizada após 7 dias (A4). Estas amostras foram conservadas num freezer a -20°C . A taxa de excreção diária estimada foi de 220 g ave^{-1} e a taxa diária de consumo de água foi de 400 mL ave^{-1} (Mentem and Pereira 2017). O experimento de antibioterapia foi devidamente autorizado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da ESALQ-USP (Processo N° 2016-13).

3.2.5.2 Curva de ruptura da matéria orgânica dissolvida (MOD) em colunas de solo

Os solos argilo-arenoso (LVAd) ou arenoso (RQo) foram empacotados conforme descrito na seção 3.2.2. Todas as colunas foram saturadas com NaNO_3 $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$

¹ a uma velocidade de transporte de $0,09 \text{ cm min}^{-1}$ por 48 h. Depois de equilibrada a vazão ($1,6 \text{ mL min}^{-1}$), foram colocadas no topo da coluna amostras de 5,0 g de cama de frango. Após a introdução da cama de frango, o fluxo foi mantido por mais 7 h. As amostras (eluato) foram coletadas a cada 12 min e sua absorbância medida a 280 nm. Este eluato é uma mistura complexa de matéria orgânica do solo (MODS) e de matéria orgânica dissolvida proveniente da cama de frango (MODCF).

3.2.6 Estudo de transporte dos fármacos da cama de frango.

3.2.6.1 Otimização do método de extração de fármacos.

Para reduzir o trabalho experimental, foi desenvolvido um desenho experimental Box-Behnken (Rocha et al. 2015) que permitiu limitar o número de experimentos. Este método quimiométrico permite o desenvolvimento de modelos matemáticos que visam estabelecer a significância estatística e a relevância dos fatores estudados, assim como as interações entre estes fatores. Este desenho mostra-se mais eficiente (eficiência = coeficientes no modelo estimado dividido pelo número de experimentos) que o desenho composto central e o fatorial completo de três níveis (Ferreira et al. 2007). Os fatores escolhidos para o desenho Box-Benken junto com os níveis estudados são apresentados na tabela 3. Em experimentos prévios foi descartado o uso do metanol, pois no caso de extração na cama de frango não foi possível a separação completa das fases orgânica-aquosas. Os experimentos realizados são apresentados de forma codificada da tabela 4

Tabela 3: Fatores escolhidos para otimização do método QuEChERS junto com os níveis estudados.

| fator | nível inferior (-1) | nível intermediário (0) | nível superior (+1) |
|--------------------------|------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| pH | 4 | 6 | 8 |
| PSA:C18 (mg) | 40:20 | 30:30 | 20:40 |
| Método de Separação | <i>Salting Out</i> | <i>Salting Out /Freezing Out</i> | <i>Freezing Out</i> |
| Concentração EDTA (M) | 0 | 0,1 | 0,2 |

Tabela 4: Experimentos necessários para otimização da metodologia QuEChERS proposta

| Ordem preparo | Ordem estatístico | pH | PSA:C18 (mg) | Método de separação | EDTA |
|------------------|----------------------|----|--------------|------------------------|------|
| 1 | 10 | 1 | 0 | 0 | -1 |
| 2 | 6 | 0 | 0 | 1 | -1 |
| 3 | 23 | 0 | -1 | 0 | 1 |
| 4 | 9 | -1 | 0 | 0 | -1 |
| 5 | 21 | 0 | -1 | 0 | -1 |
| 6 | 7 | 0 | 0 | -1 | 1 |
| 7 | 14 | 0 | 1 | -1 | 0 |
| 8 | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 9 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 22 | 0 | 1 | 0 | -1 |

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|
| 11 | 24 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 12 | 18 | 1 | 0 | -1 | 0 |
| 13 | 12 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 14 | 11 | -1 | 0 | 0 | 1 |
| 15 | 20 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 16 | 8 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 17 | 3 | -1 | 1 | 0 | 0 |
| 18 | 5 | 0 | 0 | -1 | -1 |
| 19 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 17 | -1 | 0 | -1 | 0 |
| 21 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 15 | 0 | -1 | 1 | 0 |
| 23 | 16 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 24 | 2 | 1 | -1 | 0 | 0 |
| 25 | 1 | -1 | -1 | 0 | 0 |
| 26 | 13 | 0 | -1 | -1 | 0 |
| 27 | 19 | -1 | 0 | 1 | 0 |

Para a otimização do procedimento de extração e limpeza pelo método QuEChERS foi realizado o seguinte procedimento: porções de 1,0 g de cama ou solo foram enriquecidas, em tubo Falcom de 50 mL, com 100 μ L de uma solução de trabalho contendo o analito (ENRO ou CIPRO), para obter uma concentração inicial de 100 μ g kg^{-1} . Estas amostras foram misturadas e deixadas em repouso por 24 h. Após o enriquecimento e envelhecimento, a extração foi feita com 20 mL da solução ACN-EDTA:buffer McIlvaine. A quantidade da fase aquosa (buffer-EDTA) foi fixada ao 50% devido à necessidade de garantir uma alta porcentagem de água (Blackwell et al. 2004; Guo et al. 2016). Os outros 50% correspondem à porcentagem de ACN. O tubo

com a solução extratora foi posto num vórtex por 60 s para garantir a interação homogênea do solo com o solvente, depois foi usado o ultrassom por 15 min para ajudar na extração do analito. Os tubos foram centrifugados a 8000 RCF (*Relative Centrifugal Force*) por 10 min para separar o sobrenadante. O processo de extração foi repetido para o sólido decantado. No final, foram obtidos 40 mL de extrato para os quais foi aplicado um clean-up por d-SPE (*dispersive - Solid Phase Extraction*). O primeiro passo foi a separação de fases com uma mistura de NaCl (1 g) e MgSO₄ (4 g). Logo após a adição destes sais, o tubo foi agitado manualmente por 1 min para evitar a formação de aglomerados cristalinos durante a hidratação do MgSO₄. O tubo foi centrifugado a 8000 RCF por 5 min para separar as fases e 2,0 mL da fase orgânica sobrenadante foram transferidos para um tubo de 10 mL contendo a mistura PSA:C18. A mistura foi homogeneizada num vórtex por 1 min para a correta dispersão do material e centrifugada novamente por 5 min a 4000 RCF. O sobrenadante foi separado e evaporado até um volume de 0,2 mL. A seguir, foram adicionados 0,80 mL de uma mistura ACN:0,1% ácido fórmico (20:80) (Guo et al. 2016), para finalmente, filtrar em discos de celulose de 0,22 µm e levar ao equipamento de UPLC (*Ultra-Performance Liquid Chromatography*) com detector de fluorescência (Waters, modelo Acquity).

3.2.7 Transporte dos fármacos em colunas de solo

Para os experimentos destinados a avaliar o transporte dos fármacos nas colunas de solos, foram preparadas colunas iguais de solo RQo o LVAd. Em uma foram colocados 5 g de amostra A2 de cama de frango, que conforme resultados da figura 24, contém uma concentração de $17,4 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de ENRO e $5,2 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de CIPRO. Na outra coluna foram colocados 2 g de casca de arroz (substrato da cama) enriquecidos com padrões de ENRO e CIPRO para obter a mesma concentração inicial no topo da coluna que nas colunas com cama de frango. A seguir, as colunas foram regadas com 3,5 volumes de poro de solução $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de NaNO₃.

3.3 Resultados

3.3.1 Estudo de transporte da água com o uso de um traçador conservativo

Na figura 16 são mostradas as curvas de ruptura de um volume de poro para PVP-AgNP. Estas curvas de ruptura foram ajustadas com o modelo CFITIM, que é mais simples do que o descrito na seção 3.2.3 e que se encontra explicado com mais detalhe em Yopasa Arenas et al. (2018). Este modelo de transporte de PVP-AgNP é determinístico em condições de fluxo constante de água e considera duas regiões de não equilíbrio físico (água móvel-imóvel). Verificou-se que o processo ocorre em condição de não-equilíbrio, com baixa transferência de massa entre as regiões e que o processo é predominantemente advectivo (número de Peclet= 74 ± 13 para RQo e 61 ± 6 para LVAd) e afetado levemente pelo tamanho dos poros do solo empacotado nas colunas. Este modelo permitiu a determinação da dispersão hidrodinâmica a través do número de Peclet P [-], $D_H = \nu d/P$, onde D_H é o coeficiente de dispersão hidrodinâmica [L^2T^{-1}], ν é vazão [LT^{-1}] e d é o diâmetro de grão médio ($48 \mu m$ para LVAd e $77 \mu m$ para RQo). Obteve-se um D_H de $0,71 \pm 0,13 \mu m^2 \text{ min}^{-1}$ para LVAd e $0,58 \pm 0,06 \mu m^2 \text{ min}^{-1}$ para RQo, valores sem diferença significativa ($p < 0,05$).

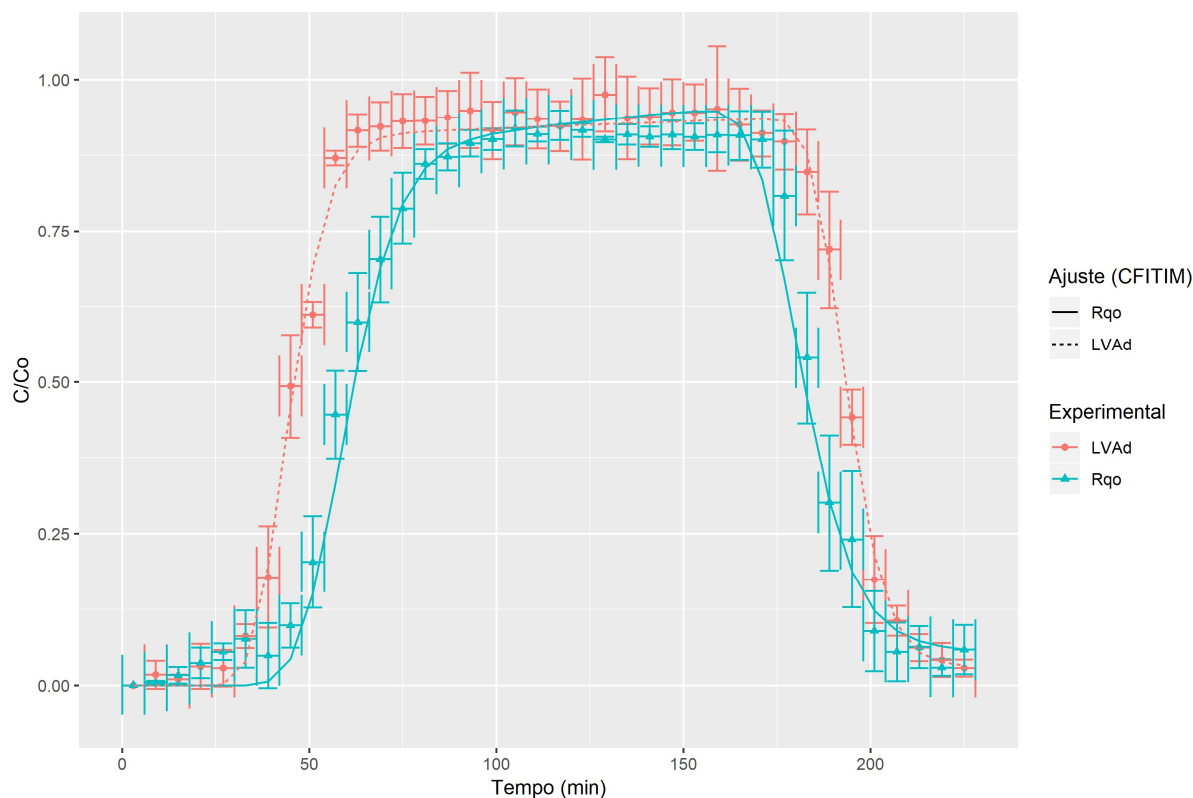


Figura 16: Curvas de ruptura de PVP-AgNPs de 25 nm em solo arenoso (RQo) e solo argiloso (LVAd).

3.3.2 Curva de ruptura de matéria orgânica dissolvida (MOD)

Na figura 17 estão apresentadas as curvas de ruptura para a matéria orgânica dissolvida (MOD) coletada na saída da coluna. Quando comparadas com as curvas de ruptura de PVP-AgNPs (Figura 16), é possível deduzir que o processo é reativo, ou seja, que existem reações entre os coloides da MOD e o solo. As diferenças de transporte da MOD nos dois solos considerados são expressivas, uma vez que, conforme descrito na seção 3.2.4, condutividade hidráulica saturada e os coeficientes de dispersão hidrodinâmica nas colunas são estatisticamente iguais. A retenção da MOD foi maior no solo argiloso (LVAd) que no solo arenoso (RQo). No RQo, a MOD apresenta alta mobilidade pois é possível observar a saída/ruptura da maioria da MOD em 420 min. No solo LVAd a retenção é maior, porém observa-se a ruptura ou saída de uma parte desta MOD, visto que a absorvância dos eluatos foi observada até pelo menos 1200 min (dados não mostrados).

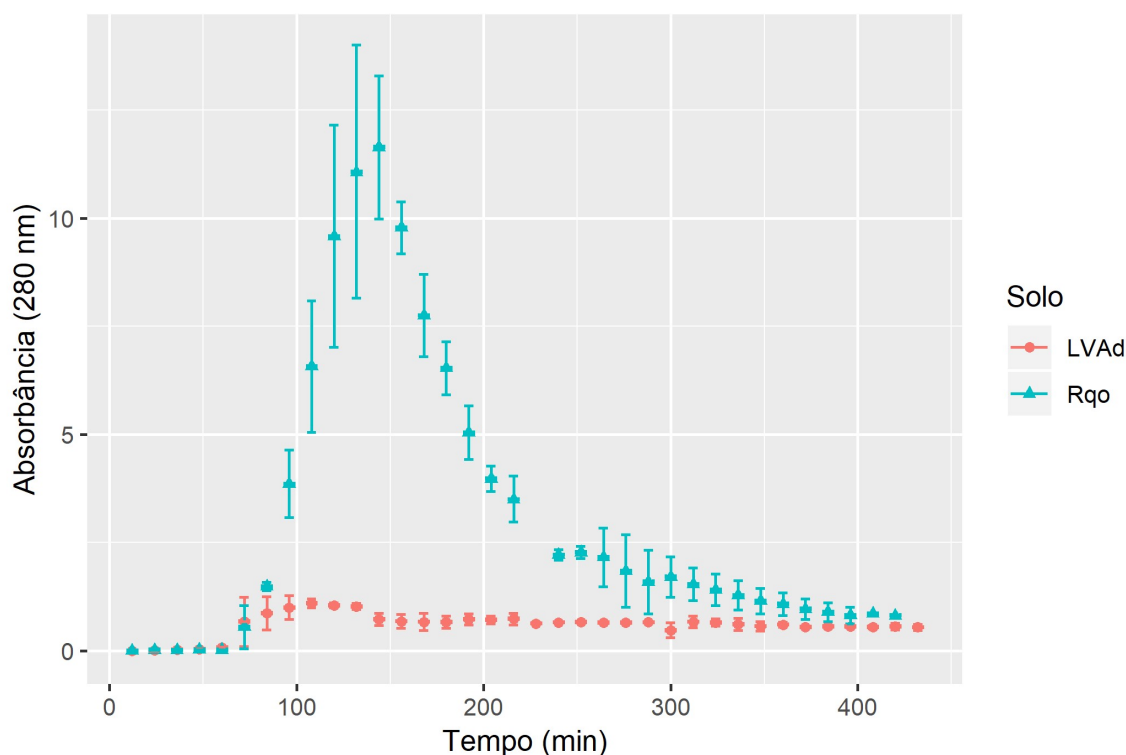


Figura 17: Curvas de ruptura de MOD proveniente da cama de frango e do solo em colunas de solo arenoso (RQo) e solo argiloso (LVAd).

3.3.3 Otimização do método analítico

A figura 18 apresenta o gráfico dos principais efeitos das diferentes variáveis obtido pelo tratamento dos dados analíticos de UPLC no Minitab V. 17.1.0. Neste planejamento a resposta corresponde às áreas dos picos de CIPRO e ENRO nos cromatogramas. Nas figuras 19 e 20 se encontram os gráficos de interação das diferentes variáveis para os dois analitos determinados. Tanto para ENRO quanto para CIPRO, observa-se uma maior eficiência da extração a pH baixo (4), uma relação PSA:C18 alta (2:1) utilizando o *salting out* como método de separação das fases e usando uma concentração de EDTA 0,1 M na solução extratora.

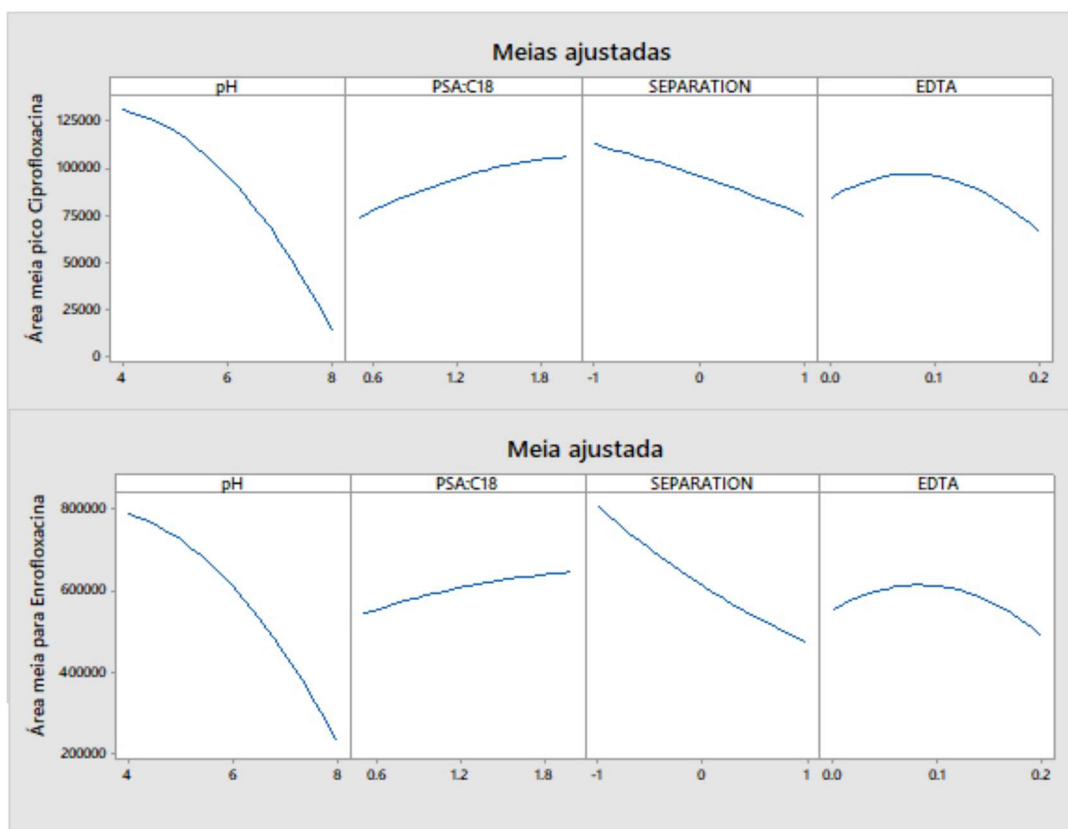


Figura 18: Gráfico de efeitos principais das variáveis seleccionadas sobre a extração de Ciprofloxacina e Enrofloxacin de matriz complexa (solo ou cama de frango)

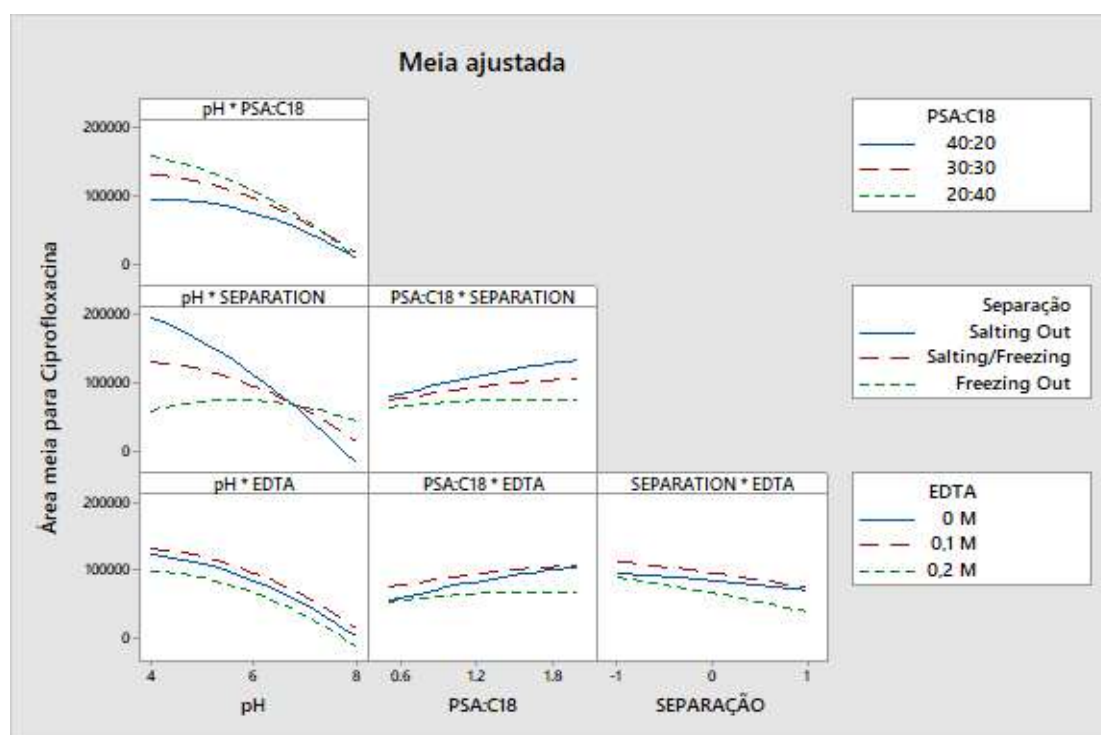


Figura 19: Gráfico de Interações entre as variáveis seleccionadas sobre a extração de Ciprofloxacina de matriz complexa (solo ou cama de frango)

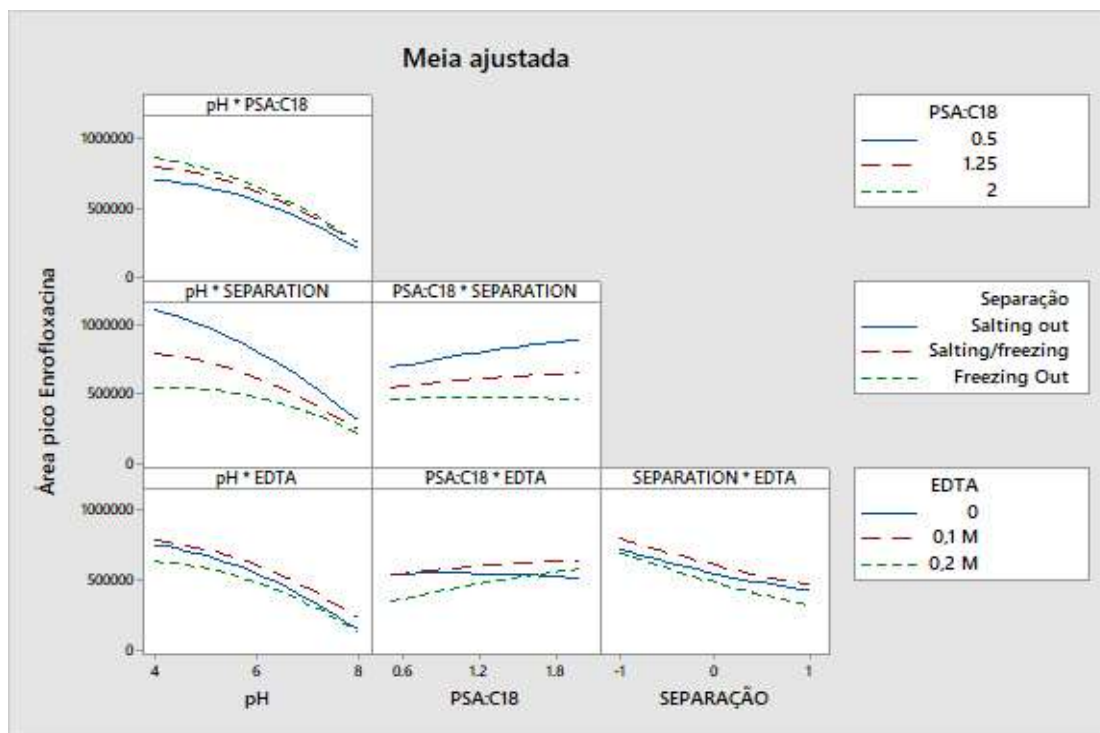


Figura 20: Gráfico de Interações das variáveis selecionadas sobre a extração de Enrofloxacin de matriz complexa (solo ou cama de frango)

3.3.4 Estudos de eficiência do método QuEChERS para extração dos fármacos

Nestes experimentos verificou-se se as condições estabelecidas para a extração na matriz considerada como mais complexa (cama de frango) funcionam para as outras matrizes consideradas mais simples (solos). Com as condições otimizadas a partir do planejamento Box-Benken, foram preparadas curvas de calibração em solvente (Acetonitrila) e na matriz antes do processo de extração. Foi preparada a mesma curva em amostras de cama de frango, solo arenoso (RQo) e solo arenoso-argiloso (LVAd).

Na figura 21 são apresentadas as curvas de calibração de CIPRO nas diversas matrizes estudadas. A comparação das inclinações das curvas analíticas obtidas em diversas matrizes com aquela obtida no solvente ACN (curva preparada e submetida

ao processo de extração e limpeza por d-SPE) permitiu evidenciar um efeito significativo na matriz na cama de frango (amplificado quando não se limpa a amostra (sem d-SPE) e no solo argiloso. No caso da ENRO (Figura 22), um efeito significativo somente foi observado na matriz de solo argiloso (LVAd). Calculando a eficiência do processo analítico (combinação da eficiência da recuperação e o efeito matriz) pela razão entre os coeficientes angulares das curvas obtemos os resultados apresentados na figura 23. Como pode se observar, a eficiência foi maior para a ENRO (entre 71,4%-89,2%). Para a CIPRO, a eficiência foi relativamente baixa (entre 38,0%-59,4%).

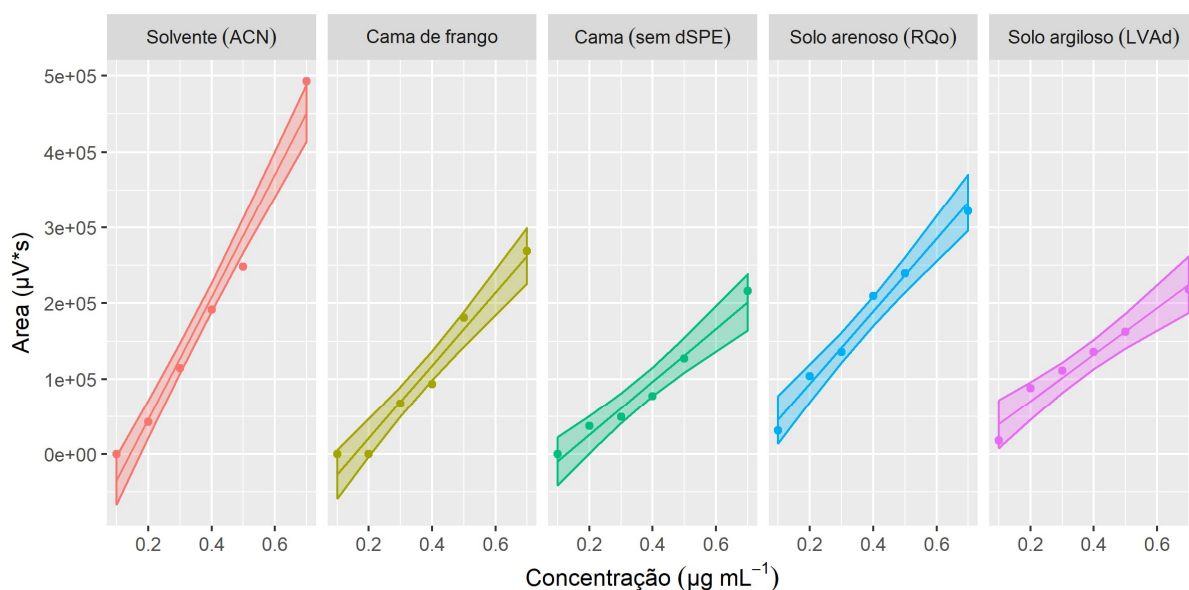


Figura 21: Curvas de calibração para Ciprofloxacina em diversas matrizes usando o método de extração otimizado.

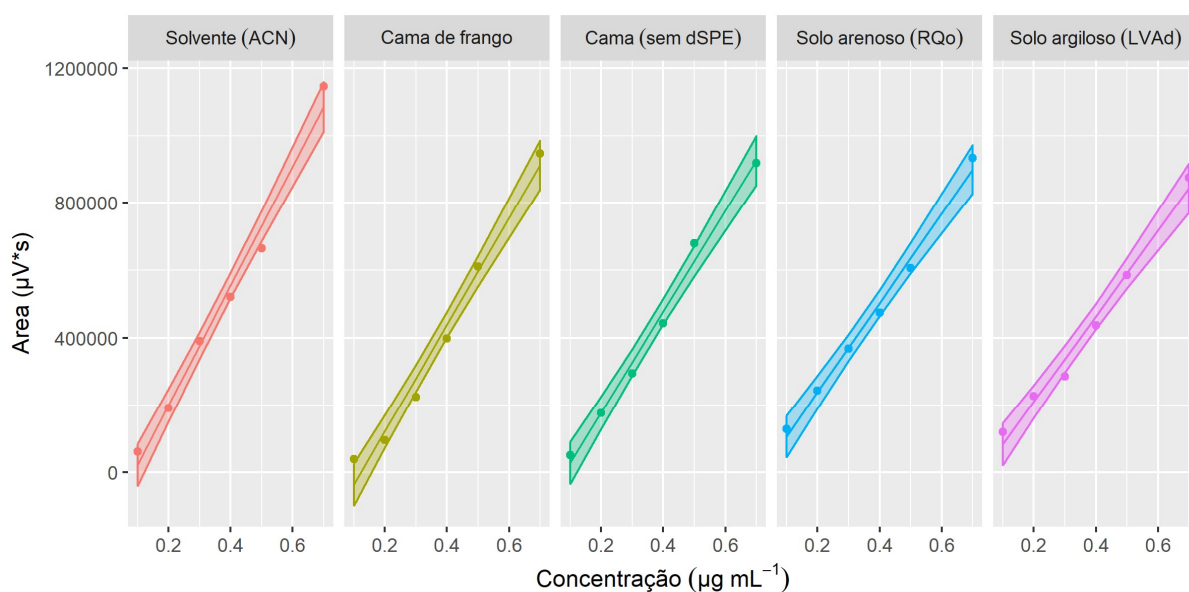


Figura 22: Área em função da concentração para Enrofloxacin em diversas matrizes usando método de extração otimizado.

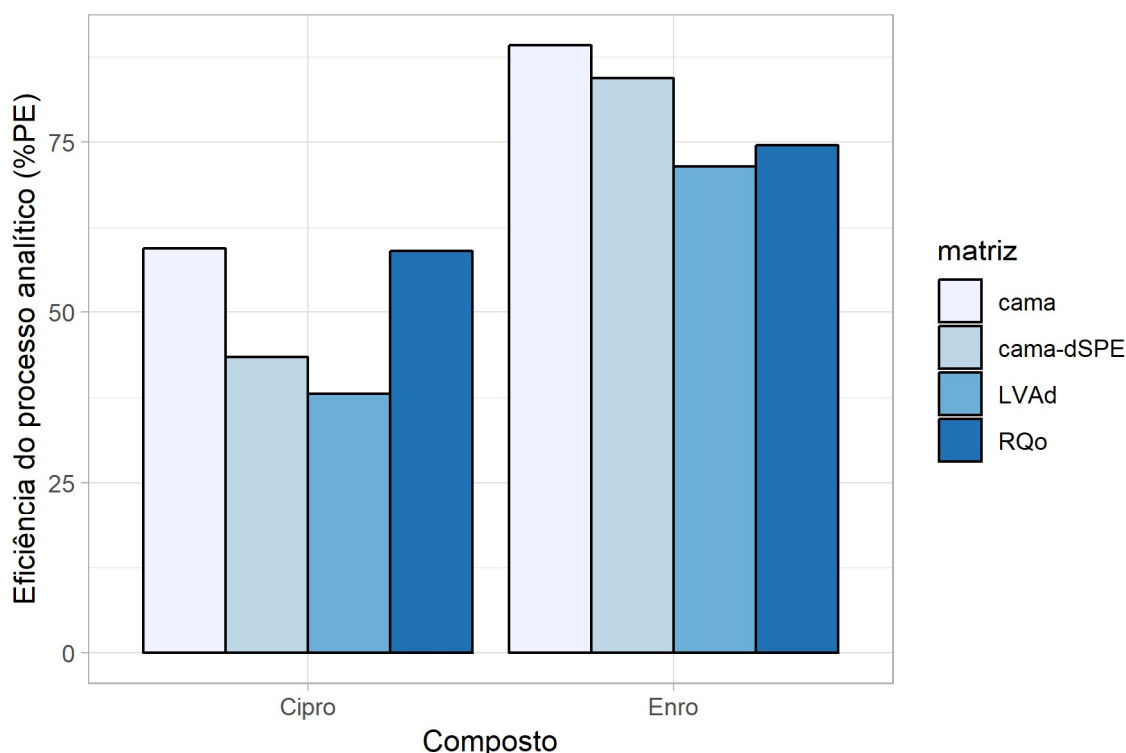


Figura 23: Eficiência do processo analítico (recuperação + efeito matriz) calculada como porcentagem da razão entre os coeficientes angulares das curvas de ENRO e CIPRO em diferentes matrizes

Estes resultados são promissórios, pois a revisão da literatura mostrou que poucos métodos “multi-matrizes” já foram estudados. No presente caso observa-se que as eficiências de recuperação não foram significativamente alteradas apesar da grande diferença entre as matrizes. Ao utilizar o mesmo método de extração-limpeza (QuEChERS modificado) é possível estudar a superfície de resposta gerada no planejamento para otimizar rapidamente o processo de extração de diferentes analitos em diferentes amostras.

As concentrações de ENRO e CIPRO encontradas nas diferentes amostras de cama de frango são apresentadas na figura 24. Os valores foram calculados usando as curvas feitas na matriz (*matrix matched calibration*) para contornar o efeito matriz. As concentrações em mg kg^{-1} estão de acordo com a quantidade administrada aos animais no experimento, o espaço amostral e às taxas de excreção reportados tanto para ENRO como para seu metabólito CIPRO (Slana et al. 2014). As concentrações

de ENRO e CIPRO na amostra branco de cama de frango (A1) foram menores que o limite de detecção do método e por isso não são apresentadas na figura 24 ($LOD=0,11 \mu\text{g ml}^{-1}$ para ENRO e $0,14 \mu\text{g ml}^{-1}$ para CIPRO, calculado como $LOD=3Sa/b$, onde Sa é o desvio padrão dos resíduos e b é coeficiente angular da curva de calibração).

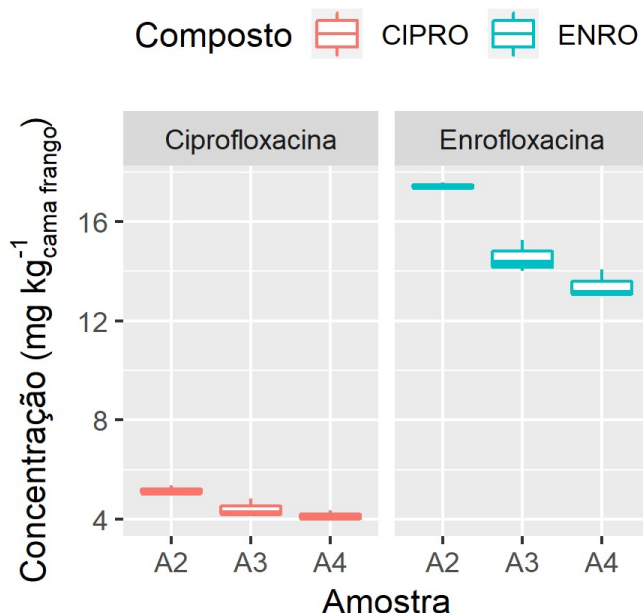


Figura 24: Concentração de ENRO e CIPRO nas amostras de cama de frango, obtida logo após o final da antibioterapia (A2)= dia 4, no final do período de carência (A3)= dia 11 (saída dos animais) e após mais 7 dias (A4)= dia 18

3.3.5 Curva de ruptura de fármacos

Utilizando o método de extração-limpeza (QuEChERS modificado) foi determinado o conteúdo de ENRO e CIPRO nos eluatos das colunas de solo. Nas mesmas condições em que foram obtidas as curvas de PVP-AgNP e MOD não se observou a ruptura (saída) de nenhum destes compostos. Este resultado confirma a dificuldade de entender o mecanismo de cotransporte de fármacos pelos coloides da MOD, pois pela informação prévia (K_d) esperava-se a ruptura de ENRO/CIPRO pelo menos nas colunas de solo arenos (RQo). Para provar ou descartar o efeito dos coloides fez-se, portanto, necessário o estudo da concentração dos dois contaminantes retidos na coluna de solo. Com esta finalidade, as colunas foram divididas em 6 porções: uma correspondente ao material no topo da coluna (cama de frango (esterco + palha) ou

palha enriquecida) e 5 porções correspondentes a fatias de coluna de 5,6 cm cada. Os resultados de concentração em função da profundidade (y) são apresentados na figura 26. A distância 0 corresponde à concentração na porção de cama de frango ou substrato residual após a percolação de 3,5 volumes de poro.

3.3.6 Modelagem das curvas de ruptura experimentais.

Para melhor entender os possíveis mecanismos envolvidos no processo de cotransporte, os dados experimentais foram modelados em HYDRUS-1D. O software permite que os usuários otimizem até 15 parâmetros (NPaD é o número máximo permitido de parâmetros otimizados). Os problemas de otimização em condições de fluxo saturado (este trabalho) geralmente são mais fáceis e permitem a otimização de mais parâmetros quando comparados com as condições do fluxo insaturado, onde é incomum otimizar muitos parâmetros simultaneamente. No entanto, não é recomendado otimizar muitos parâmetros simultaneamente devido à dificuldade de encontrar uma resposta única pelo método Hydrus (Marquardt-Levenberg), pois o método procura o mínimo local em uma função e, com menos definição dos parâmetros/variáveis/limites mais mínimos locais existem, ou seja, mais soluções (Šimůnek et al. 2015).

Ao utilizar o módulo C-Ride três solutos foram considerados (colóides, soluto sorvido nos colóides e soluto livre). Logo as condições iniciais devem ser dadas para os três solutos. As condições iniciais precisam ser especificadas para colóides (móveis) suspensos na fase líquida (Concentração 1, C_c) e colóides (imóveis) ligados à fase sólida (S_c^{att}), para soluto em colóides móveis (Concentração 2, $S_{mc}C_c$), para soluto em colóides imóveis ($S_{ic}S_c^{att}$), para soluto na fase líquida (Concentração 3, C), e para soluto cineticamente sorvido à fase sólida (S_k).

Em todos os casos temos uma coluna de 30 cm de comprimento, com uma porosidade de 0,55 para solo Rqo e 0,70 para o LVAd, e uma condutividade hidráulica saturada de 5,4 cm h⁻¹ para as duas colunas. O sistema foi considerado saturado com uma velocidade de transporte de 0,12 cm min⁻¹. O volume de poro foi assim igual a 138 min para RQo ($L\theta_s/q = 30 * 0,55/0,12 = 138$) e 175 min para o LVAd ($L\theta_s/q = 30 * 0,70/0,12 = 175$). Nestes experimentos, o soluto entrou na coluna do solo sorvido aos colóides (cama de frango contaminada).

Para a sorção de solutos na fase sólida do solo foi considerada a sorção linear no equilíbrio, que é tipicamente representada matematicamente pelo coeficiente de distribuição (ou coeficiente de partição sólido-líquido), K_d . A aplicação do conceito de K_d resulta em solutos sendo sorvidos instantaneamente na fase sólida, ocasionando o atraso da saída do soluto, o que é descrito pelo fator de retenção R definido como $R = 1 + \rho K_d / \theta$ (Rassam et al. 2018), onde K_d ($\text{L kg}^{-1} = \text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$) é um fator de distribuição empírico da isoterma de sorção linear que relaciona S (a concentração sorvida, isto é, os solutos sorvidos às partículas do solo, $\text{g}_{\text{solute}} \text{ g}_{\text{solo}}^{-1}$) com C (a concentração no espaço poroso líquido, $\text{g}_{\text{solute}} \text{ cm}^{-3}$), θ é o teor de água (igual à porosidade no caso de saturação total, $\text{cm}^3 \text{ cm}^{-3}$) e ρ é a densidade aparente (g cm^{-3}).

Para explicar o comportamento da matéria orgânica (Fig. 17) e do fármaco (Fig. 26) de acordo com o modelo descrito na seção 4.3, é necessário definir uma série de parâmetros de entrada para componentes individuais (coloides, soluto associado a coloides e soluto). A definição de parâmetros iniciais se baseia na análise dos resultados tanto de curvas de ruptura (seção 4.4, 4.5.2 e 4.6.3) como de análise de composição da MOD e suas interações com o fármaco (próximos capítulos); os valores de entrada e os parâmetros otimizados são apresentados nas tabelas A1 a A4, apresentadas no anexo I.

Com o conjunto de valores otimizados foi possível modelar com bom ajuste as curvas de ruptura de matéria orgânica (Fig. 25) e a concentração de fármaco em função da distância de penetração no solo (Fig. 26). Nos experimentos que comparam o transporte em função da distância foram preparadas colunas iguais de solo RQo o LVAd, em uma foram colocados 5 g de amostra A2 de cama de frango, que conforme resultados da figura 24, contém uma concentração de $17,4 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de ENRO e $5,2 \pm 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de CIPRO. Na outra coluna foram colocados 2 g de casca de arroz (substrato da cama) enriquecidos com padrões de ENRO e CIPRO para obter a mesma concentração inicial no topo da coluna ($17,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ de ENRO e $5,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ de CIPRO).

Na figura 26 a distância 0 (zero) corresponde à concentração obtida no resíduo de cama após a passagem de 3,5 volumes de poro de solução $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de NaNO_3 . É observada uma transferência alta do fármaco da cama ao solo (89,3-95,2%) devido ao cotransporte destes junto com os coloides dissolvidos da matéria orgânica da cama

de frango. No caso do experimento sem fezes (só palha de arroz) é observada uma baixa transferência do fármaco para o solo (55,2-61,9%). É claro também o aumento da mobilidade dos fármacos no solo. No caso do solo RQo, os fármacos chegaram até 20 cm de profundidade, no caso em que não se introduzem coloides o fármaco que chega ao solo fica retido nos primeiros 2 cm. Comparando os dois solos o cotransporte é maior no solo arenoso, resultado congruente com as curvas de ruptura da MOD (figura 25) que mostram uma maior retenção no solo argilo-arenoso (LVAd). A recuperação do fármaco, (soma concentrações 0-30 cm no final do experimento/ concentração inicial) x100 é apresentada na tabela 5.

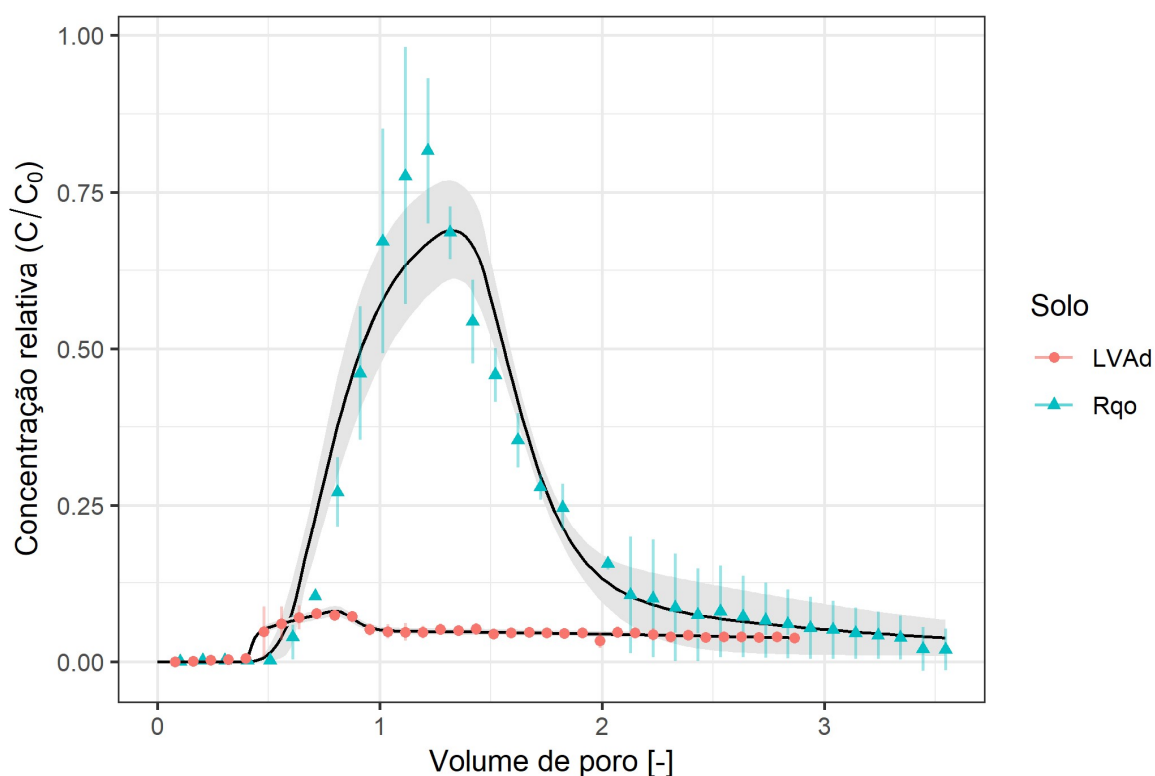


Figura 25: Curvas de ruptura ajustadas pelo modelo de transporte facilitado por coloides cftr do c-ride da MOD proveniente da cama de frango e do solo em colunas de solo arenoso (RQo) e solo argiloso (LVAd).

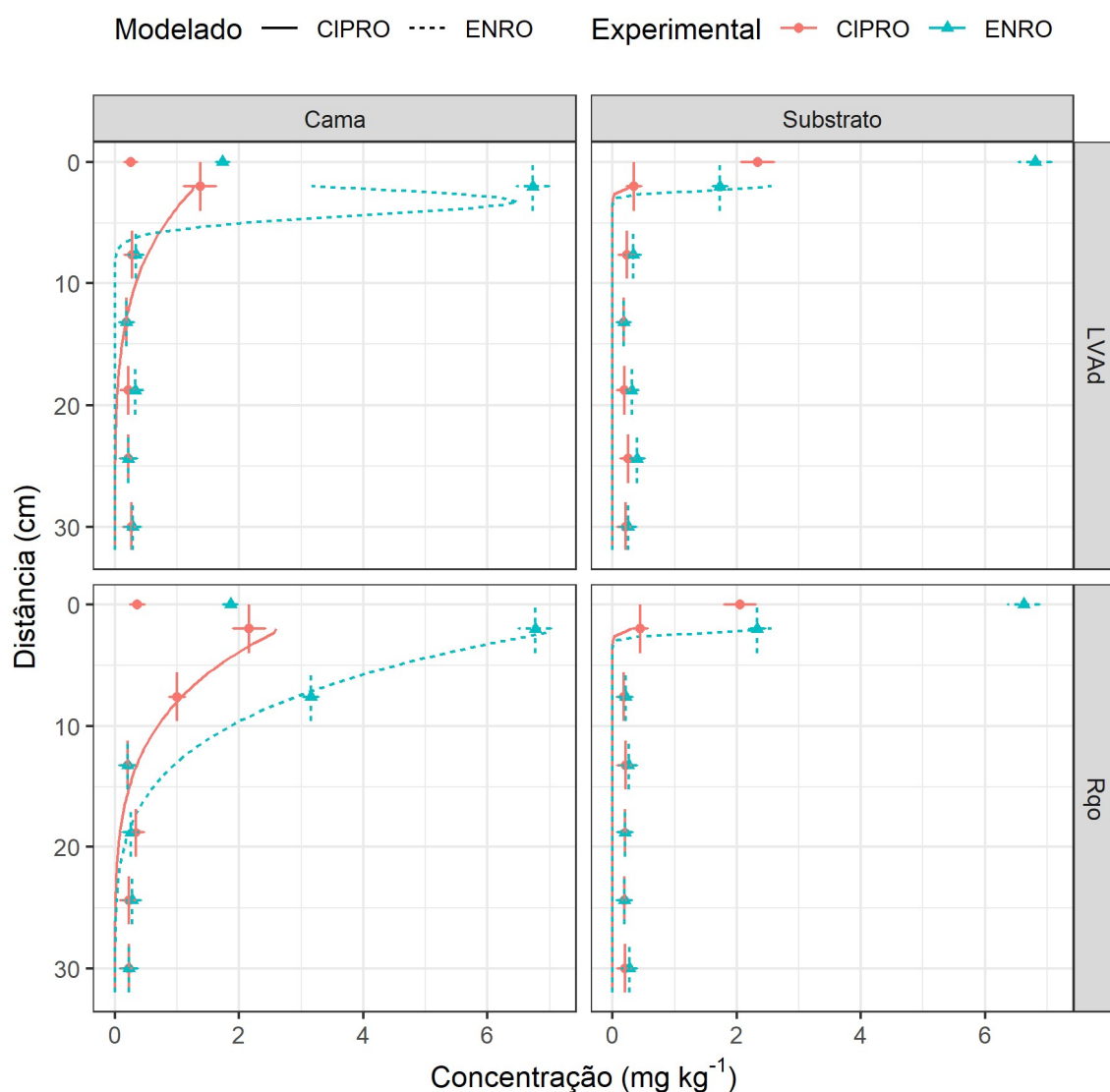


Figura 26: Concentrações experimentais e modeladas de ENRO e CIPRO em diferentes profundidades da coluna, obtidas logo após o final da percolação de 3,5 volumes de poro

Tabela 5: Recuperação dos fármacos no experimento de transporte em colunas. Concentração no resíduo no topo da coluna mais a soma das concentrações (2,5-30 cm) comparado com a concentração inicial.

| Solo | Coluna | Recuperação ENRO (%) | Recuperação CIPRO (%) |
|------|--------|-------------------------|--------------------------|
| LVAd | Cama | 56 | 53 |

| | | | |
|------|-----------|----|----|
| RQo | Cama | 73 | 87 |
| LVAd | Substrato | 57 | 72 |
| RQo | Substrato | 58 | 67 |

A diferença do 100% pode ser explicada pela formação de resíduos não extraíveis na coluna e também pelo fato de existir degradação no tempo do experimento. Pois a diferença de temperatura entre o estocagem (-4 °C) e o experimento (ambiente ~30 °C) é considerável e a temperatura ambiente os fenômenos microbiológicos se aceleram. Estes fenômenos podem explicar o fato de que não tenha sido comprovada experimentalmente a saída de uma fração de ENRO/CIPRO junto com a matéria orgânica (soluto sorvido aos coloides) nas curvas de ruptura. Fazendo uma simulação direta com os parâmetros definidos nas tabelas 5-8 (anexo I), esta fração é predita e aparece nos tempos de saída da MOD. Nas figuras 27 e 28 são apresentadas estas curvas de ruptura modeladas.

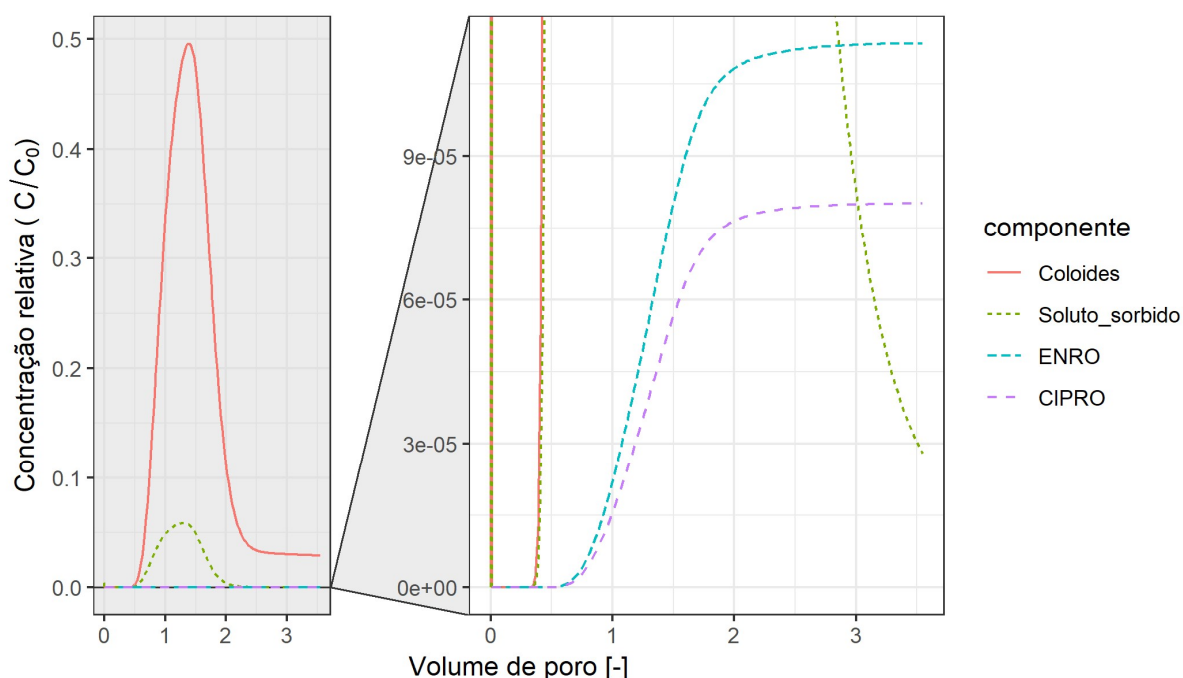


Figura 27: Curvas de ruptura modeladas para coloides, solutos sorvidos nos coloides e solutos no solo argilo-arenoso (LVAd). É possível observar a saída de fármacos nos eluatos porém em uma concentração não detectável experimentalmente.

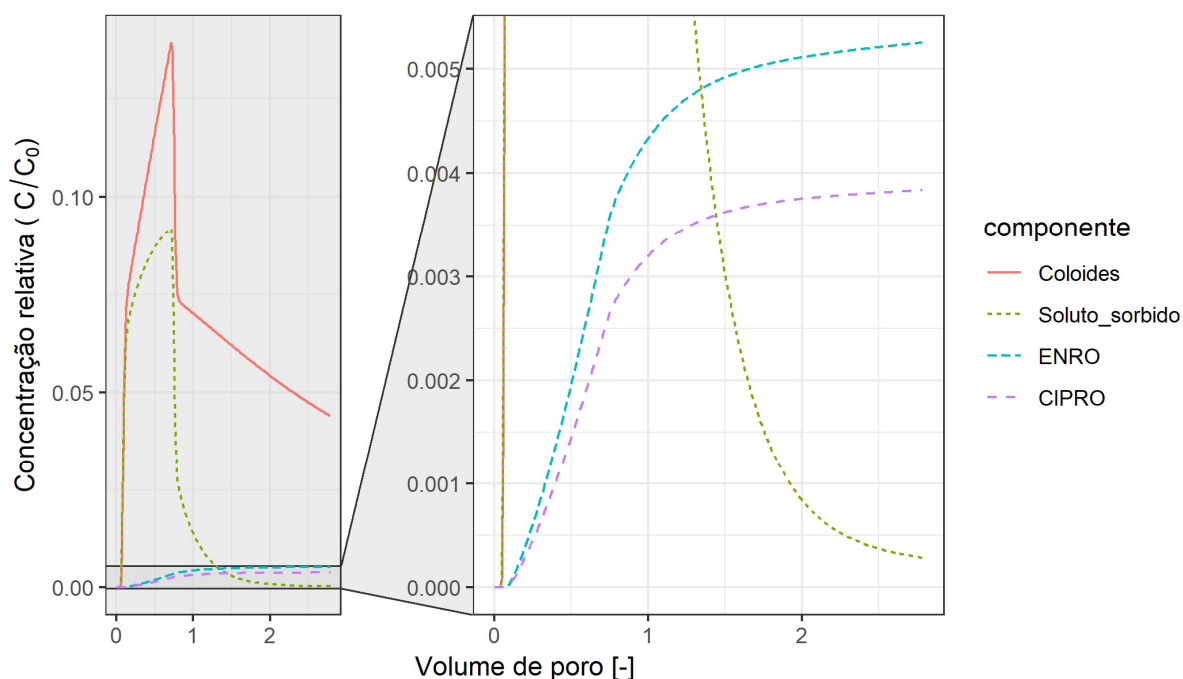


Figura 28: Curvas de ruptura modeladas para coloides, solutos sorvidos nos coloides e solutos no solo arenoso (RQo).

Uma hipótese para explicar que o soluto sorvido ao coloide não tenha saído pela coluna é que o composto formado pelos coloides da MOD e o fármaco seja de natureza distinta dos outros compostos da MOD que saem entre 0,5 e 2 volumes de poro, ou que exista alguma reação de desprendimento levando à dessorção do soluto do coloide. A liberação do soluto na solução provocaria uma retenção na fase sólida do solo, evitando uma ruptura rápida devida ao cotransporte. Assumindo uma imobilização do soluto sorvido aos coloides é observado que os coeficientes μ_{cw} (SinkL1) e μ_{cs} (SinkS1) de 0,05 para o solo RQo (Fig. 29) e 0,3 para LVAd (Fig. 30) conseguem “eliminar” a ruptura do componente fármaco-coloide.

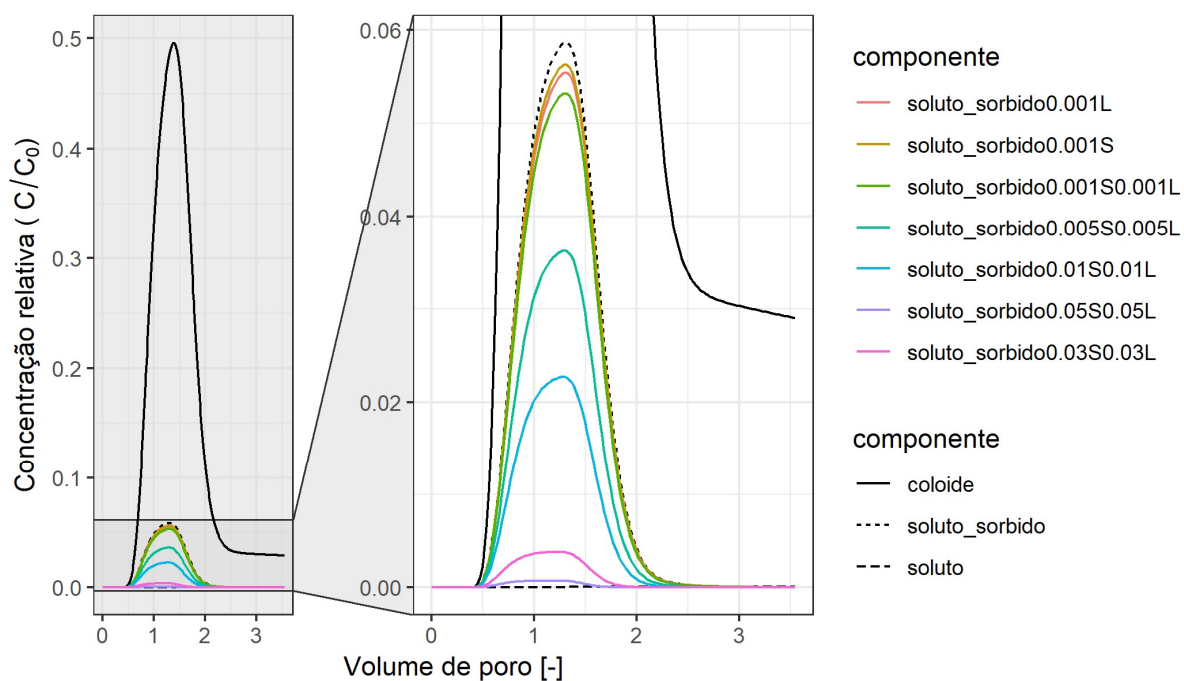


Figura 29: Efeito dos parâmetros de imobilização do soluto retido aos colóides, μ_{cw} (SinkL1= L no gráfico) e μ_{cs} (SinkS1= S no gráfico), na ruptura deste soluto no solo RQo. Valores de 0,05 simulam os resultados experimentais, onde não foi observada a ruptura da ENRO ou CIPRO.

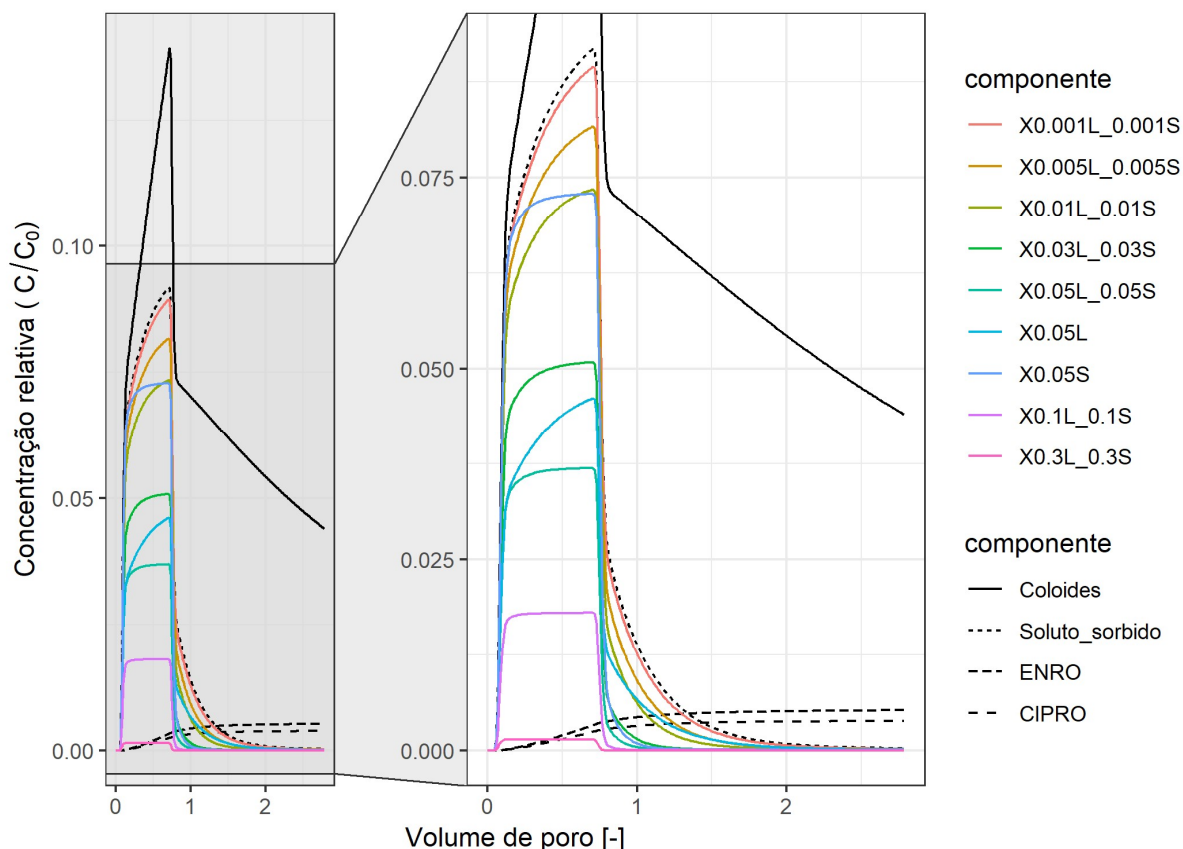


Figura 30: Efeito dos parâmetros de imobilização do soluto retido aos coloides, μ_{cw} (SinkL1= L no gráfico) e μ_{cs} (SinkS1= L no gráfico), na ruptura deste soluto no solo LVAd. Valores de 0,3 simulam os resultados experimentais, onde não foi observada a ruptura da ENRO ou CIPRO.

Para refinar o modelo e comprovar este tipo de hipótese faz-se necessário realizar um estudo mais aprofundado que permita comprovar que existem diversos componentes na MOD com mobilidade diferenciada. Com esta finalidade, foi proposto a análise de componentes por PARAFAC apresentado no próximo capítulo do trabalho.

4 Caracterização da matéria orgânica dissolvida (MOD) no processo de transporte por meio da análise de matrizes de excitação-emissão (EEM) por meio da técnica PARAFAC

4.1 Introdução

A matéria orgânica do solo (MOS) é um dos componentes do solo mais complexo porém menos conhecido (Ammari et al. 2014; Masoom et al. 2016). A MOS é a soma de materiais orgânicos diversos tais como organismos vivos e compostos gerados de resíduos de plantas e animais, em variados estados de decomposição. A MOS é complexa e heterogênea devido aos fatores físicos, químicos e ambientais que atuam no momento de sua formação. A complexidade e heterogeneidade dificultam sua caracterização, não sendo possível definir uma estrutura única. Métodos de caracterização clássicos utilizam extrações múltiplas e fraccionamentos, técnicas lentas que necessitam o uso de solventes orgânicos e podem alterar a matéria orgânica durante o processo. O fraccionamento da MOS em ácido húmico, ácido fúlvico e huminas não é muito recomendado atualmente uma vez que a heterogeneidade das frações obtidas pode afetar a reprodutibilidade. Além do mais, estas frações são definidas operacionalmente e não representam entidades reais do solo (Ellerbrock and Gerke 2013; Ammari et al. 2014). A fração da MOS solúvel em água, chamada de matéria orgânica dissolvida (MOD) dos poros, é uma fração que corresponde aproximadamente a 1-10% do total de matéria orgânica, mas é a fração com maior mobilidade e reatividade da MOS (Ohno et al. 2008). A MOD dos poros é um material produzido por fenômenos geomorfológicos similares aos que produzem a MOD de águas superficiais ou marinas. Sua composição é também similar à MOD destas águas abertas, com diferenças em sua composição química e de cromóforos dependendo do seu confinamento e de condições tais como disponibilidade de oxigênio, temperatura e microbiota (Nebbioso and Piccolo 2013).

Para entender como compostos orgânicos interagem com a MOS faz-se necessária a determinação da composição desta matéria orgânica, mas a obtenção de informação até o nível molecular continua sendo um desafio analítico. Técnicas como pirólise acoplada a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (Py/GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), termoquimiolise com hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) ou outras técnicas de rompimento, e a ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido usadas para caracterizar a MOS de fontes diversas. Entretanto, a maioria destes métodos mostram tendências e possuem problemas para resolver completamente a mistura de numerosos componentes da matéria orgânica natural (Sleighter and Hatcher 2007). GC-MS e LC-MS de baixa resolução não são técnicas adequadas para análise de MOS uma vez que requerem a volatilização ou solubilização da amostra, limitando a sua utilização ao estudo de somente uma porção da MOS. Um uso mais efetivo destas técnicas necessita a degradação química da MOS para obter moléculas menores que podem ser derivatizadas ou volatilizadas (Sleighter and Hatcher 2007). A principal desvantagem da pirólise e da quimiolise é que são técnicas que podem facilmente formar compostos que não são constituintes naturais da MOS, além de ser seletivas nos tipos de moléculas que podem ser analisadas. Finalmente, técnicas clássicas de RMN dão informações sobre grupos funcionais presentes, mas não permitem obter detalhes a nível molecular, além de requerer concentrações relativamente altas destes componentes (Minor et al. 2014).

A espectrometria de massas de ressonância de íon cíclotron com transformada de Fourier (FT-ICR-MS) é talvez a única técnica analítica que permite estudar a maioria dos componentes individuais da MOS. A FT-ICR-MS tem um poder de resolução elevado que, para componentes individuais da MOS, permite obter erros, em valores de m/z , inferiores a 0,5 ppm para componentes de ~ 400 Da (Minor et al. 2014). Com esta técnica, é possível calcular a fórmula empírica de milhares de componentes a partir de valores de m/z , utilizando técnicas quimiométricas tais como os diagramas de van Krevelen que usa as relações H/C e O/C (Nebbioso and Piccolo 2013). Informações estruturais adicionais sobre componentes individuais podem ser obtidas em estudos de FT-ICR-MS-MS usando dissociação induzida por colisão (CID) (Minor et al. 2014).

Como desvantagem das técnicas de espectrometria de massas aparece que, dados de fórmula empírica, peso molecular e alguma informação de estrutura via derivatização e fragmentação, não são suficientes para estabelecer a estrutura completa de componentes individuais da MOS (Minor et al. 2014). Outra desvantagem é a dificuldade de se transformar todos os analitos da amostra em íons observáveis. Fontes de ionização típicas como o eletrospray (ESI), ionização à pressão atmosférica (API), ionização química (CI) e fotoionização à pressão atmosférica (APPI) não são universais, uma vez que cada fonte responde melhor a certas classes de compostos. Desvantagens adicionais são às interferências por contaminantes, supressão de sinal por coanalitos e a degradação de analitos na fonte de ionização. Adicionalmente a FT-ICR-MS não é hifenada facilmente; acoplamento com LC só é possível no modo off-line (Nebbioso and Piccolo 2013; Minor et al. 2014). Para ajudar à caracterização desta MOS complexa é, portanto, necessário somar informação de outras técnicas como a RMN.

A RMN é fundamental para complementar porque a ionização não é requerida para a excitação e detecção dos núclídeos ^1H e ^{13}C . A RMN, tanto em solução como em estado sólido são técnicas bem estabelecidas, e informações sobre estrutura molecular podem ser obtidas de espectros mono, bi ou tridimensionais. Outra técnica cujo uso está em aumento é a de rotação das amostras em torno do Ângulo Mágico de alta resolução (HR-MAS), aplicada a amostras semissólidas de MO e ácidos húmicos coloidais. Porém, esta técnica não possui o poder de radiofrequência necessário para estudar o componente sólido dos solos, componente importante para a retenção a longo prazo de contaminantes (Nebbioso and Piccolo 2013; Masoom et al. 2016). Recentemente Masoom et al. (2016) descreveu uma nova forma experimental da RMN, chamada de RMN multifase compreensiva (CMP-RMN). Esta CMP-RMN permite o estudo de todas as fases físicas da MOS. Estes novos resultados confirmam que os componentes estruturais principais da MOS são macromoléculas que vem da degradação de biomassa.

Devido às várias limitações das técnicas de ressonância e espectrometria de massas mais avançadas na análise de DOM, existe um interesse crescente em aplicações avançadas de espectroscopia de UV-Vis e fluorescência, devido à sua confiabilidade analítica em análises tanto qualitativos quanto quantitativos (Nebbioso and Piccolo 2013; Liang et al. 2017; Zhu et al. 2018). A espectroscopia de matriz de

excitação-emissão combinada com análise de fatores paralelos (PARAFAC) é uma ferramenta empírica para a caracterização de conjuntos de dados muito grandes, que permite examinar como os componentes ajustados variam geograficamente e sazonalmente (Sharpless and Blough 2014), o que é de grande interesse para o estudo de transporte em sistemas ambientais naturais (Gu et al. 2007; Liu et al. 2009; Valencia et al. 2014; Daouk et al. 2015; Vaz et al. 2015).

A análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de uma amostra isolada de MOD produz um espectro simples em relação ao de compostos puros devido à sobreposição de muitas bandas espectrais da MOD, que é extremamente heterogênea. A resolução em tais espectros pode ser aumentada usando a segunda derivada para identificar picos individuais dentro das respostas sobrepostas ou usar a auto-deconvolução de Fourier (Minor et al. 2014). Uma abordagem adicional para investigar o conteúdo informacional de um conjunto de análises por FTIR consiste em aplicar cálculos generalizados de espectroscopia de correlação bidimensional (2D-COS) baseados em perturbações no conjunto de dados (Noda and Ozaki 2005). Nessa abordagem a segunda dimensão é uma perturbação que ocorre através do conjunto de amostras (por exemplo, um gradiente de carbono orgânico). Com esta análise são identificadas correlações em fase e fora de fase nas intensidades espectrais dos picos em função da perturbação. Como nem todos os picos mostram as mesmas tendências de perturbação (ou seja, entre amostras), essa abordagem também ajuda a desconvoluir picos sobrepostos (Minor et al. 2014). A 2D-COS Hetero-espectral IR/fluorescência pode fornecer a localização de grupos funcionais em diferentes frações de MOD, o que pode relacionar a resposta de grupos funcionais à ligação de moléculas orgânicas (FTIR) e à capacidade de complexação de frações individuais da MOD (Ammari et al. 2014; Tang et al. 2019).

Para melhor entender o processo das interações em nível molecular, foi realizada uma caracterização estrutural e um estudo de interações entre os componentes da matéria orgânica natural e os fármacos. Com esta finalidade, foi proposto o estudo de medidas espectrofotométricas (espectroscopia de fluorescência e no infravermelho com transformada de Fourier) associadas a técnicas quimiométricas/matemáticas como são o PARAFAC e a correlação bidimensional (2D-COS).

4.2 PARAFAC para o estudo da natureza e transporte dos componentes da MOD

4.2.1 Introdução

A análise de fatores paralelos (PARAFAC) é utilizada em química para decompor dados que estão organizados como estruturas de ordem 3 ou mais e para facilitar a identificação e quantificação dos sinais independentes subjacentes chamadas de “componentes”.

As matrizes de excitação-emissão (EEM) podem ser organizadas num arranjo cúbico de dimensões $I \times J \times K$, onde I é o número de amostras, J é o número de comprimentos de onda de emissão e K é o número de comprimentos de excitação. O método PARAFAC decompõe o arranjo para produzir um conjunto de termos trilineares e um arranjo de residuais, de acordo com a equação 1. O ajuste é feito de modo a minimizar a soma dos quadrados dos residuais (e_{ijk})

$$X_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}; \quad i = 1 \dots J; \quad j = 1 \dots J; \quad k = 1 \dots K \quad (Eq. 1)$$

Nesta equação, X_{ijk} é a intensidade da fluorescência para a amostra i no comprimento de onda de emissão j com comprimento de excitação k ; cada f corresponde a um componente, cada um com um número de *scores* a igual a I , ou seja, um *score* para cada amostra. Cada componente também possui J valores de b ; um por cada comprimento de onda de emissão e por último K valores de c , um por cada comprimento de onda de excitação. Num modelo válido, é possível fazer uma interpretação química destes componentes, uma vez que o parâmetro a_{if} é diretamente proporcional à concentração do analito f da amostra i , e que o vector b_f com elementos b_{jf} é uma aproximação do espectro de emissão do analito f ; da mesma maneira, o vector c_f com elementos c_{kf} é linearmente proporcional aos coeficientes de absorção específica (Stedmon and Bro 2008; Murphy et al. 2013).

4.2.2 Método

As matrizes de excitação-emissão (EEM) das amostras de matéria orgânica dissolvida foram obtidas num espectrofotômetro Varian Cary Eclipse a temperatura ambiente. As matrizes foram obtidas medindo a intensidade da fluorescência em comprimentos de onda de emissão entre 250-600 e comprimentos de onda de excitação entre 200-450 nm com incrementos de 5 nm. As fendas de emissão e excitação foram ajustadas a 5 nm e a velocidade de varredura foi ajustada a 1200 nm min⁻¹. O arranjo cúbico é assim formado pelas dimensões amostras x comprimento de onda de excitação x comprimento de onda de emissão. Antes da análise por PARAFAC, foi necessário fazer um pré-processamento que consiste na subtração do branco, a remoção da dispersão, a correção do filtro interno e uma normalização Raman. Este pré-processamento e a análise foram conduzidos em R V.3.4.4 (R Core Team 2018) com os pacotes eemR V.0.1.5 (Massicotte 2017) e staRdom V.1.0.12. (Matthias and Daniel 2018). A decomposição PARAFAC foi feita no staRdom; foram estudados modelos entre 2 e 7 componentes. O número de componentes foi determinado por análise de resíduos, análise por divisão no meio (*split half*), diagnóstico da consistência de núcleo (CORCONDIA) e inspeção visual (Huang et al. 2018). Um resumo das etapas do processo pode ser visto na figura 31. Mais detalhes dos algoritmos e os processos internos da análise podem ser obtidos em Murphy et al. (2013) e na documentação dos pacotes de R citados e do pacote *multiway*.

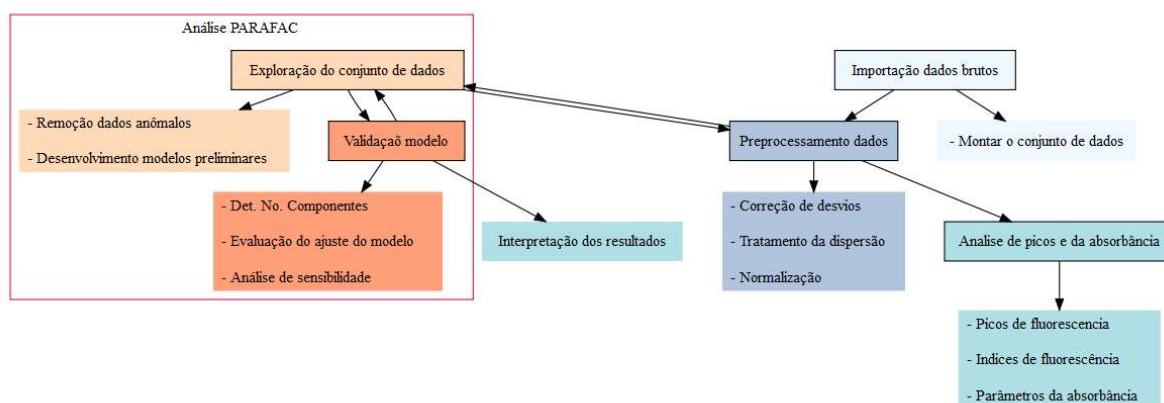


Figura 31: Resumo das etapas do tratamento de dados dos espectrofotômetros UV/Vis e de fluorescência.

4.2.3 Resultados.

4.2.3.1 Preparação e correção dos dados.

O desvio da linha de base instrumental nos dados de absorbância foi removido subtraindo-se a média da absorbância em comprimentos de onda elevados; neste trabalho foi usado o espectro entre 680 e 700 nm. Os efeitos do filtro interno (EFI) ocorrem quando a luz de excitação é absorvida pelos cromóforos. Um método simples para corrigir o EFI é a utilização da absorbância da amostra; a EEM é multiplicada por uma matriz de correção correspondente a cada par de comprimento de onda (Kothawala et al. 2013). Neste trabalho, foi necessário diluir as amostras por um fator de 7 para obter uma absorbância menor que 1,5. Absorbâncias maiores que 1,5 são altas demais para serem corrigidas pela função EFI aplicada (ou IFE matemática em geral). A fluorescência foi normalizada para uma escala padrão de unidades Raman dividindo todas as intensidades pela área do pico Raman (excitação de 350 nm entre uma emissão de 371 nm e 428 nm) de uma amostra de água MilliQ® (Lawaetz and Stedmon 2009). Esta normalização permite a comparação de dados de diferentes fluorômetros ou configurações diferentes no mesmo fluorômetro. As áreas de espalhamento Rayleigh e Raman foram removidas para posteriormente serem interpoladas por meio do algoritmo PCHIP (*Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomial*). Matrizes de excitação-emissão originais são apresentadas na figura 32, e o resultado da correção dos dados é mostrado na figura 33.

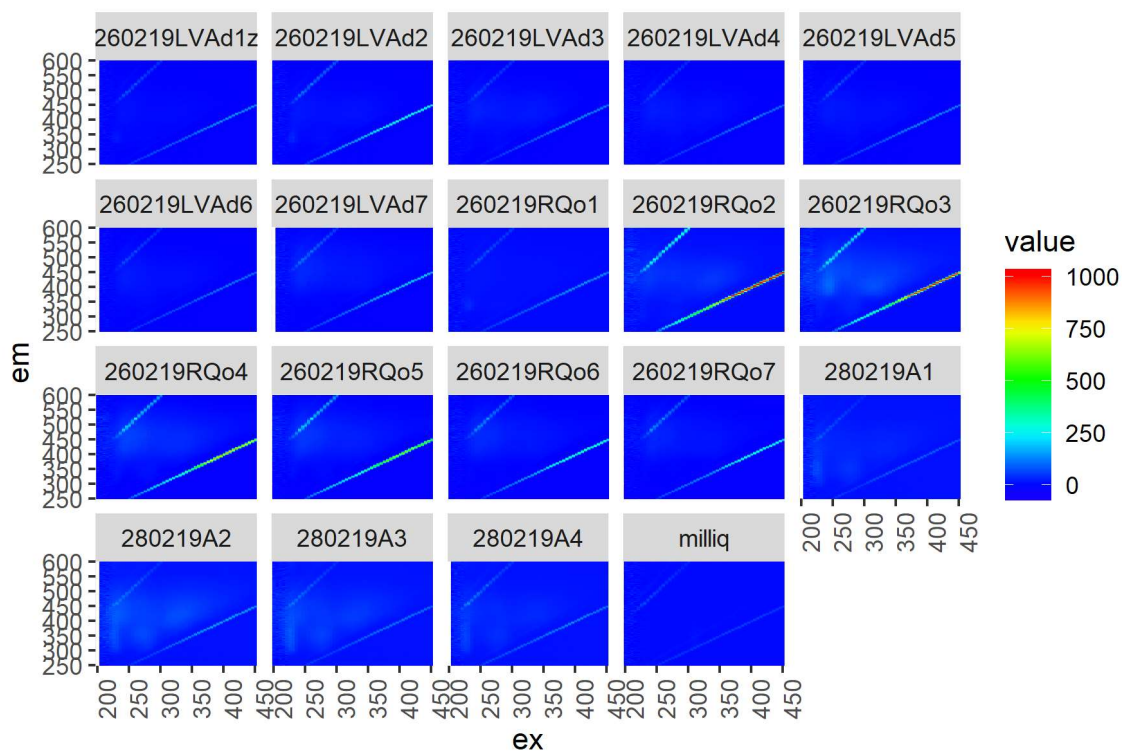


Figura 32: Matrizes de excitação-emissão originais

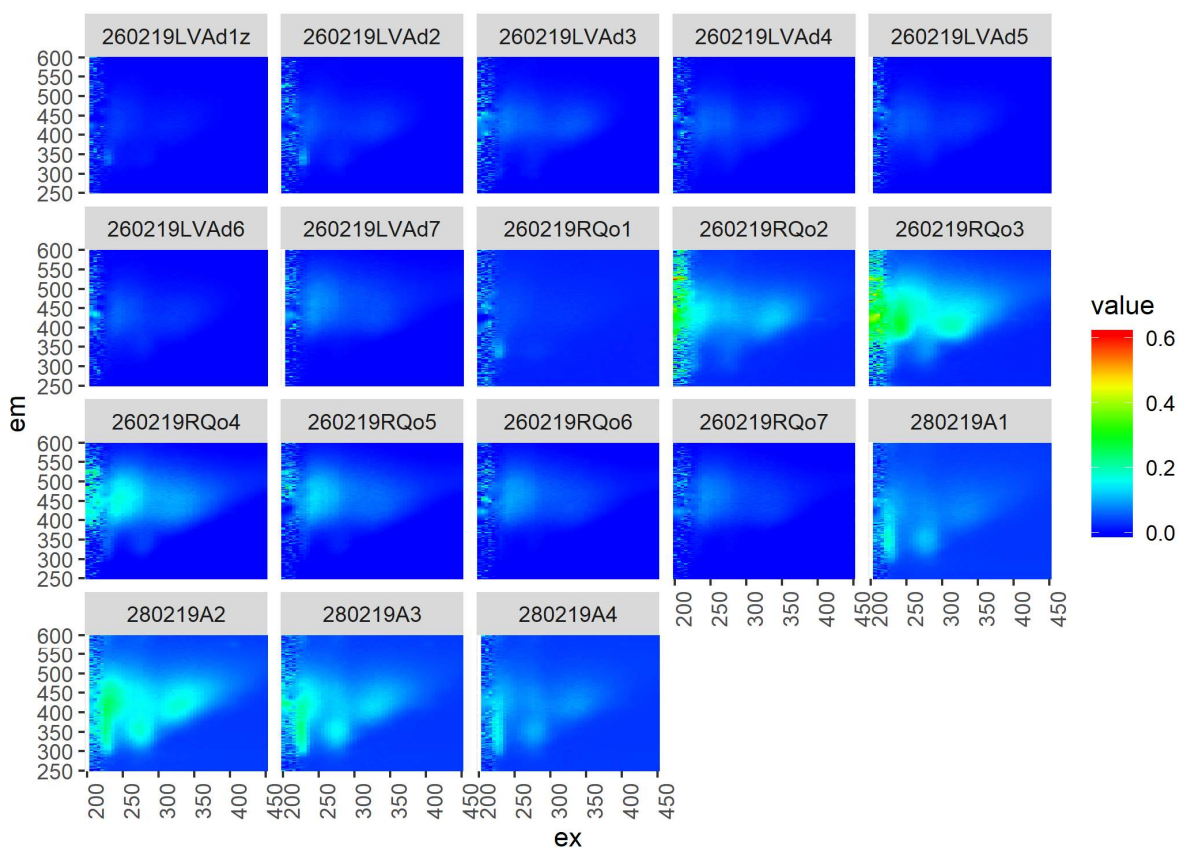


Figura 33: Matrizes de excitação-emissão preparadas e corrigidas (filtro interno, linha base, dispersão Rayleigh e Raman) para análise PARAFAC

4.2.3.2 Criação do modelo PARAFAC

Encontrar um modelo apropriado para o PARAFAC é um processo iterativo (Murphy et al. 2013). O número de modelos similares dos quais o melhor é escolhido foi 20, o número máximo de iterações na análise PARAFAC foi de 5000 com uma tolerância de 10^{-5} . Na figura 33, pode ser observado o aumento do ruído instrumental em comprimentos de onda de excitação entre 200-220 nm. Esta zona de alto ruído precisou então ser removida de todas as amostras. Várias restrições foram testadas (sem restrições, não-negatividade e uni-modalidade); os melhores resultados foram encontrados usando a suposição de que os modos são não-negativos. Esta é uma suposição muito comum porque a fluorescência não pode ser negativa.

Na figura 34, é possível comparar as cargas (*loadings*) espectrais dos diferentes modelos gerados (2-7 componentes). Espectros de fluoróforos independentes que não interagem apresentam sobreposição mínima (geralmente <50 nm) entre os espectros de excitação e emissão. Os espectros de excitação podem ter múltiplos picos, mas os espectros de emissão exibem um único pico distinto. Quando um espectro de excitação tem dois ou mais picos, indicando bandas de absorção de estado excitado consecutivas, alguma absorção (excitação) ocorre entre estes picos e os espectros de excitação e emissão não exibem mudanças abruptas (Murphy et al. 2013). Tendo isto em mente, é possível observar que após 4 componentes, um ou mais dos modos de emissão e excitação perdem a forma característica de espectros de fluorescência, este é um indício de que o número de componentes apropriado é 4.

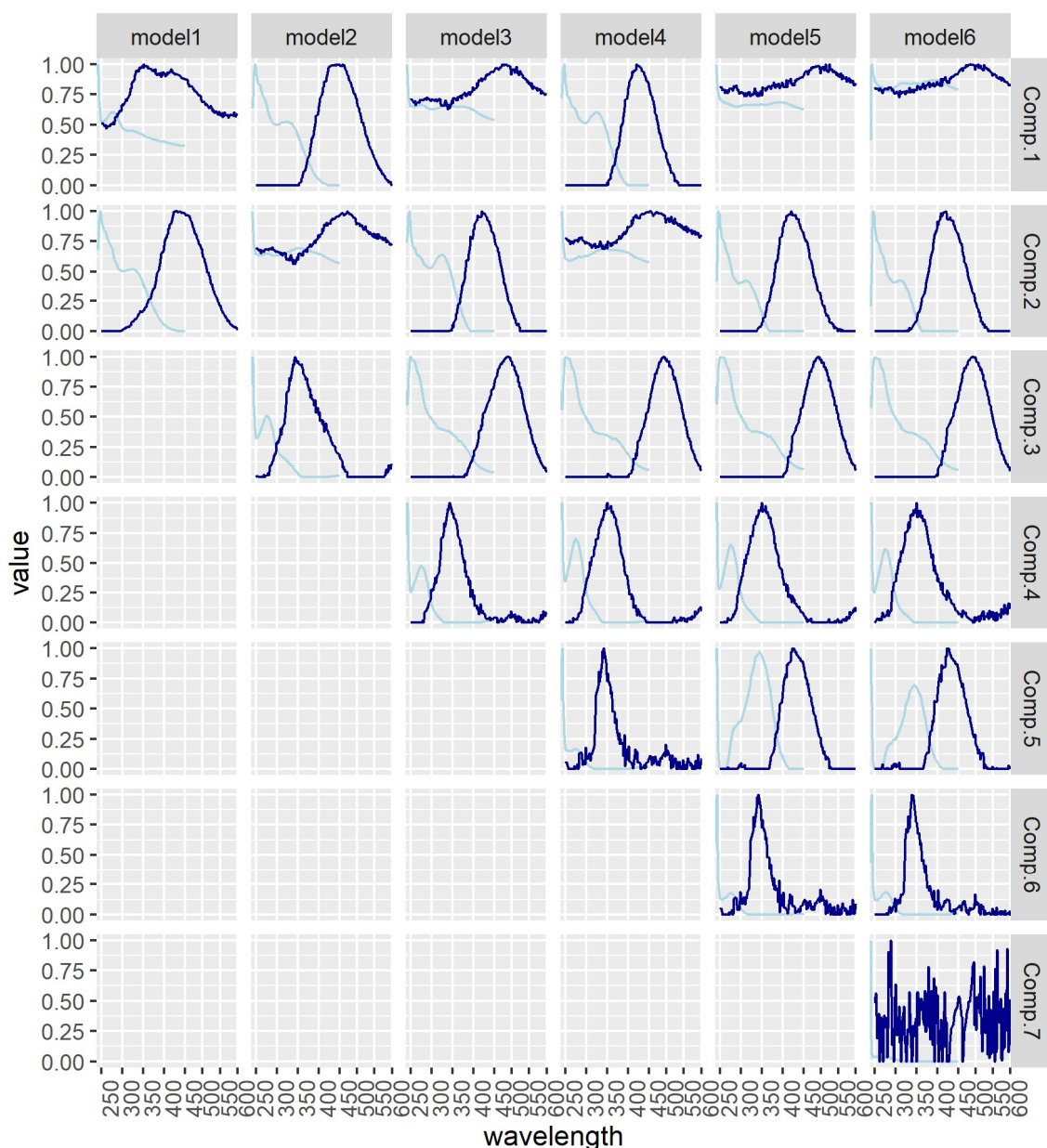


Figura 34: Contribuição (loadings) de emissão e excitação para os componentes de diferentes modelos gerados de PARAFAC (2-7 componentes). Um modelo de mais de 4 componentes começa a apresentar componentes sem significado químico (picos de emissão distintos múltiplos, sem evidência de excitação entre bandas de absorção consecutivas e mudanças espectrais abruptas em distâncias de comprimentos de onda curtos (Murphy et al. 2013).)

Isto foi também testado estudando os resíduos (Fig. 35), a correlação entre os componentes (Fig. 36), estudando a estabilidade através da análise de partição no meio (*split half analysis*, Fig. 37) e a consistência do núcleo. Na figura 38 são apresentados os componentes recalculados com maior precisão (10^{-8}) e na figura 39

são mostrados os *loadings* ou pseudo-concentrações ao longo das amostras. Estes *loadings* mostram as diferenças de fluorescência de diferentes componentes em diferentes amostras.

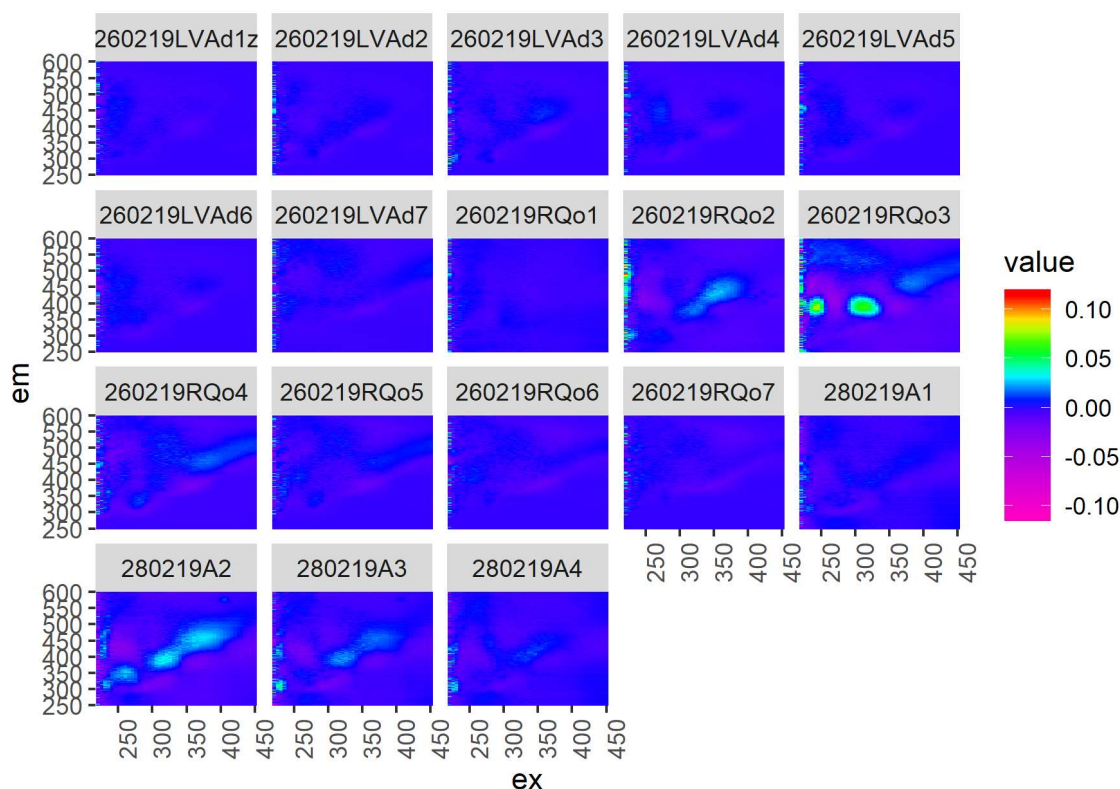


Figura 35: Gráfico de resíduos do modelo. Embora apresentem valores de mais ou menos 10%, estes valores são produtos de picos que ocorrem ao longo da diagonal devido à incompleta remoção da dispersão e podem ser ignorados, uma vez que eles não são trilineares e não devem aparecer no modelo (Murphy et al. 2013).

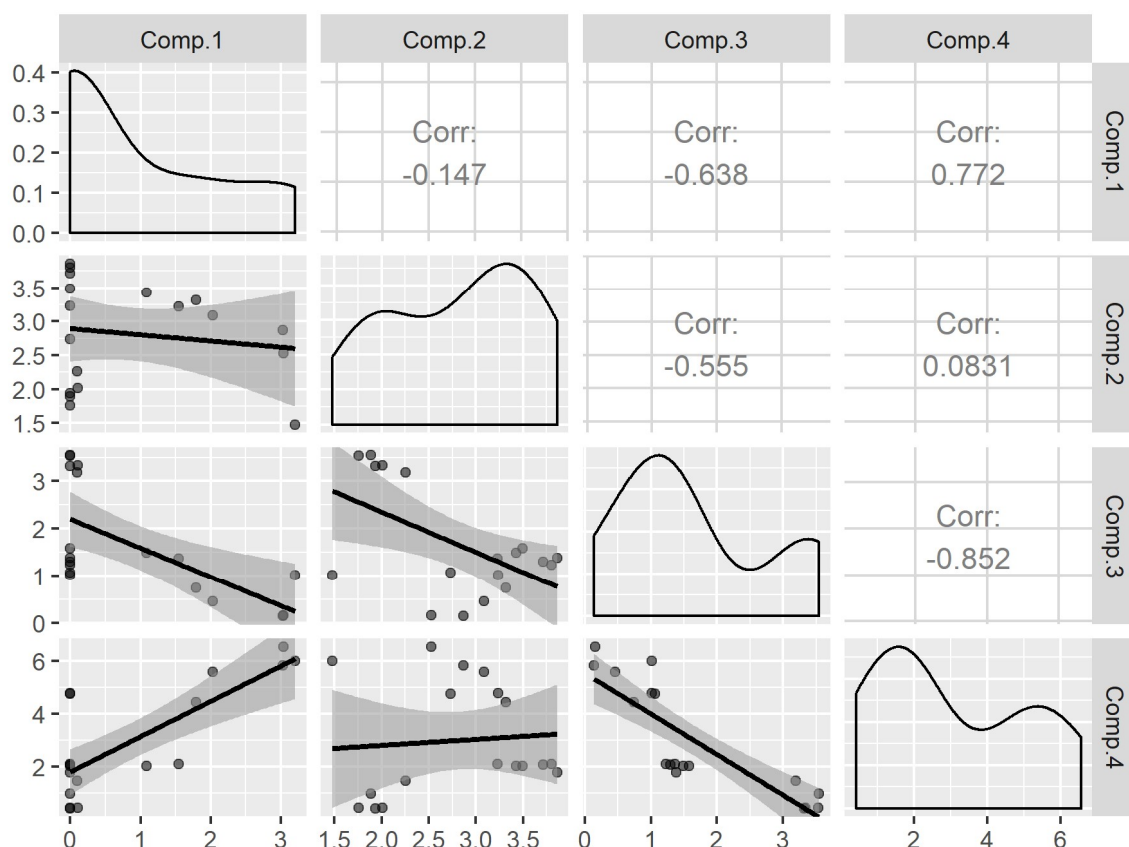


Figura 36: Diagrama de correlação que mostra que, após normalização e decomposição, os componentes não apresentam correlação significativa, uma das premissas do algoritmo PARAFAC.

Componentes fortemente correlacionados violam o pressuposto de variabilidade do modelo PARAFAC: nenhum dos dois componentes químicos pode ter intensidades de fluorescência perfeitamente cobertas ou espectros idênticos.

Uma das maneiras mais poderosas de confirmar que um modelo PARAFAC é apropriado é produzir modelos idênticos a partir de subamostras independentes do conjunto de dados. Normalmente, isso só é possível para conjuntos de dados relativamente grandes, é muito recomendada a validação de modelos usando vários testes de *Split half*, nos quais vários modelos são criados e comparados após a divisão do conjunto de dados pela metade de diferentes maneiras.

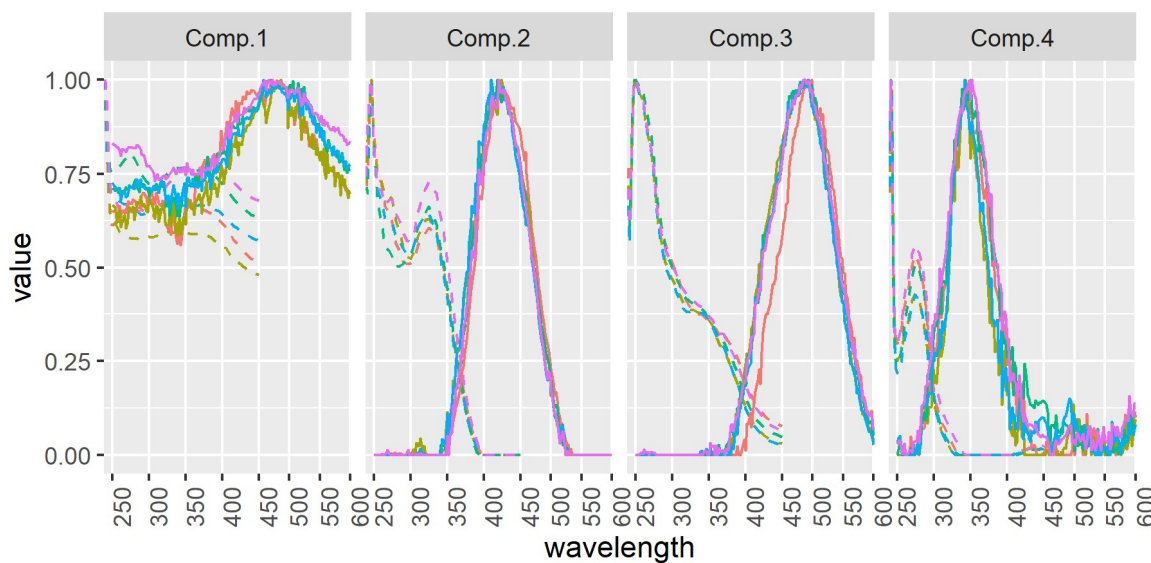


Figura 37: Resultado gráfico da análise split half. São apresentados resultados de recombinações do conjunto de dados de 6 formas diferentes. Como todos os gráficos de todos os componentes são similares em forma (coeficiente de congruência de Tucker próximo a 1) pode-se falar que o modelo de 4 componentes é estável.

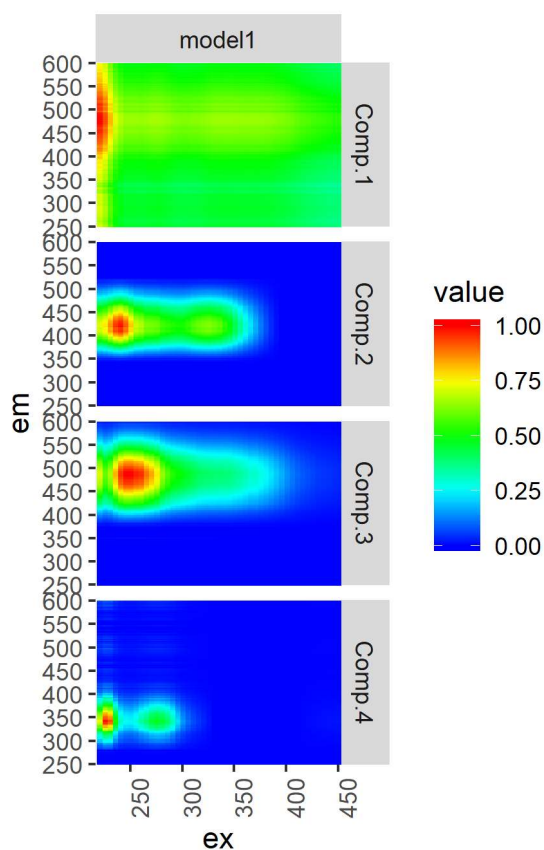


Figura 38: Componentes do modelo PARAFAC. Conforme o modelo global (Yu et al. 2015), componente 1= fluorescência de ácido húmico de tipo terrestre poluída com

águas residuais (G6). Componente 2= fluorescência de ácidos húmicos de origem/tipo microbiano (G1). Componente 3= de tipo húmico de águas superficiais (G6). Componente 4= proteína, fluorescência de estruturas tipo triptofano com origem em águas residuais.

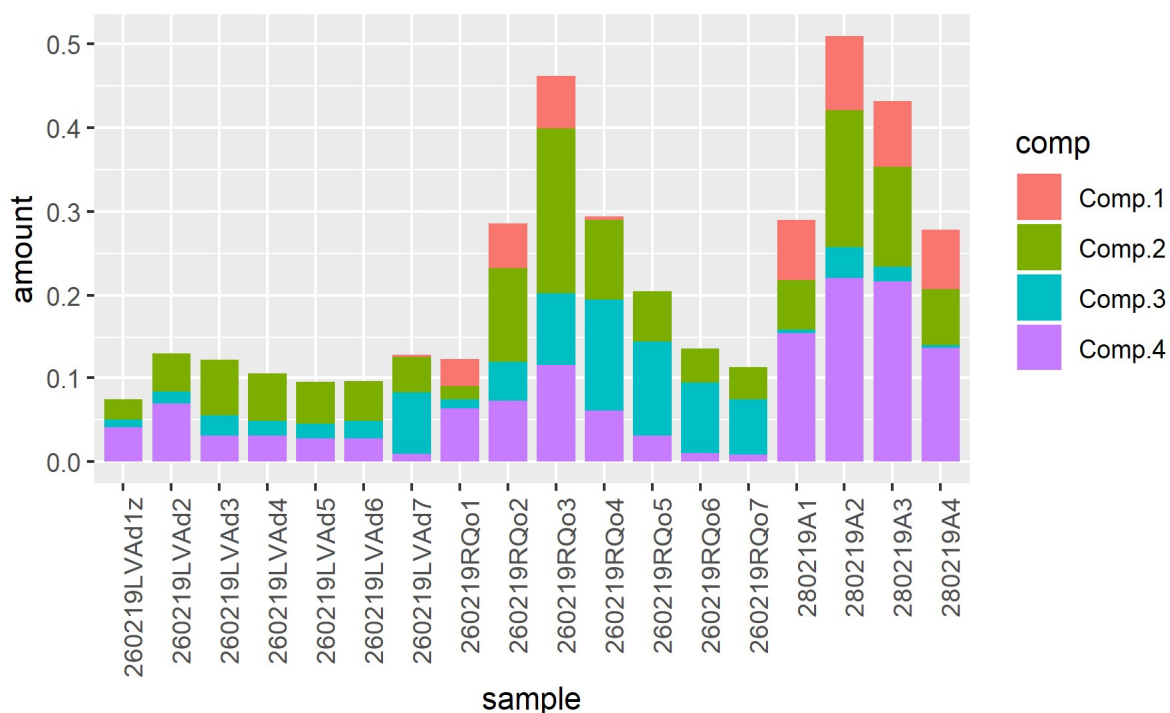


Figura 39: diagrama de pseudo-concentrações ou *loadings* que permite comparar a retenção-mobilidade de componentes da MOD.

É possível dizer a partir da Figura 39, que, em geral, o componente de ácido húmico de origem microbiano (componente 2-G1) apresenta pouca retenção nos dois tipos de solo (argiloso LVAd e arenoso RQo) quando comparado com proteína (componente 4-G4) e ácido húmico de origem terrestre poluído com compostos da cama de frango (nutrientes + matéria orgânica, componente 1-G6). O componente 3 é possivelmente ácido húmico do solo RQo (MODS) transportado pela água, isto indica que a retenção é menor quando comparado com o solo LVAd, no qual a retenção da matéria orgânica é mais forte. O máximo dos componentes superpostos, como mostra a figura, possui a mesma forma que as curvas de ruptura analisadas pelo monitoramento da absorbância (Fig. 26), resultado esperado num modelo PARAFAC consistente e com significado químico.

Após a análise destes resultados, é possível afirmar que o número mais provável de componentes da matéria orgânica dissolvida é 4, porém, embora existem

similaridades, a interação do fármaco por estes compostos é diferenciada. Para o estudo de interação foi proposto a análise de espectros de correlação bidimensional, como explicado a seguir.

4.3 Espectroscopia de correlação bidimensional (2D-COS) para o estudo da interação de fármacos veterinários com a matéria orgânica dissolvida de solos (MODS)

4.3.1 Introdução

O processo de transporte de fármacos veterinários em solos depende fortemente da ligação destes com a matéria orgânica dissolvida (MOD) (Fu et al. 2016). Devido à complexidade da MODS, são necessárias técnicas matemáticas como a espectroscopia de correlação bidimensional (2D-COS) para o estudo das mudanças dos sinais espectrais (Ammari et al. 2014). Neste trabalho estudou-se a perturbação da extinção da fluorescência sincronizada e o sinal de infravermelho para elucidar a ligação entre ENRO e a MOD.

A 2D-COS é uma técnica aceita e poderosa que ajuda a entender sistemas até o nível molecular. A 2D-COS generalizada é uma técnica de análise de dados, usada para examinar variações sistemáticas da maioria dos sinais analíticos, obtidos com diversos instrumentos espectroscópicos, tais como: IR, NIR, Raman, Uv-Vis, fluorescência, dicroísmo circular vibracional (VCD), atividade óptica Raman (ROA), raios X e RMN, assim como sinais cromatográficas e microscópicas (Park et al. 2016). Em 2D-COS, a variação do sinal analítico é induzida pela imposição de uma perturbação externa, podendo ser esta: mecânica, elétrica, térmica, química, biológica entre muitas outras (Park et al. 2016). A forma da perturbação não é mais limitada à sinusoidal simples, uma vez que existem métodos mais eficientes baseados na transformada de Hilbert discreta.

O espectro dinâmico $\tilde{y}(\lambda, t)$, para as mudanças espectrais $y(\lambda, t)$ em função da variável espectral λ e a variável de perturbação t , é definida como (Fu et al. 2016):

$$\tilde{y}(\lambda, t) = \begin{cases} y(\lambda, t) - \bar{y}(\lambda) \\ 0 \end{cases} \quad \begin{matrix} \text{para } T_{min} \leq t \leq T_{max} \\ t < T_{min} \text{ ou } t > T_{max} \end{matrix}$$

Onde $\bar{y}(\lambda) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} y(\lambda, t) dt$ é o espectro de referência. T_{min} e T_{max} são os valores mínimos e máximos da perturbação. O espectro síncrono 2D-COS, Φ é descrito como:

$$\Phi(\lambda_1, \lambda_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_T^{T_{max}} \tilde{y}(\lambda_1, t) \cdot \tilde{y}(\lambda_2, t) dt$$

Onde T é o valor da variável de perturbação, e λ_1 e λ_2 representam os comprimentos de onda no espectro 2D-COS. O espectro assíncrono Ψ , é obtido do espectro dinâmico $\tilde{y}(\lambda_2, t)$, é o espectro ortogonal obtido por transformada de Hilbert $\tilde{z}(\lambda_2, t)$ como:

$$\Psi(\lambda_1, \lambda_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_T^{T_{max}} \tilde{y}(\lambda_1, t) \cdot \tilde{z}(\lambda_2, t) dt$$

4.3.2 Materiais e métodos

4.3.2.1 Experimento de perturbação da fluorescência.

Conforme obtido por meio da decomposição de matrizes de excitação-emissão, o número de componentes da matéria orgânica dissolvida é 4. Isto permite o uso da espectroscopia de fluorescência sincronizada para reduzir o tempo de análise das amostras sem perder muita informação. A perturbação da fluorescência da MOD (MODS + MODCF) devido à adição de ENRO foi estudada conforme proposto por Liang et al. (2017). Alíquotas de 5,0 mL da solução diluída (1:7) de MOD foram tituladas em tubos Falcon® de 10 mL que continha soluções de ENRO. A concentração de MOD foi no intervalo de 0–12 mg C L⁻¹ (como carbono orgânico dissolvido) na solução final; a concentração final de ENRO na solução final foi fixada a 300 µg L⁻¹, isto porque a ENRO e demais fluoroquinolonas fluorescem. O espectro de fluorescência sincronizada das amostras tituladas foi obtido no mesmo espectrofotômetro Varian Cary Eclipse. O espectro de excitação foi obtido no intervalo de 250-600 nm com um *offset* constante ($\Delta\lambda$ = 60 nm) e uma velocidade de varredura de 120 nm min⁻¹.

4.3.2.2 Análise por espectroscopia de infravermelho ATR-FTIR.

Espectros de infravermelho foram obtidos na configuração de refletância atenuada (ATR-FTIR) num espectrofotômetro Cary 630 (Agilent, USA). 200 mL de soluções de MOD fortificada com ENRO, nas mesmas concentrações utilizadas para a análise de fluorescência, foram filtrados num disco de PFTE de 5 mm a uma vazão $Q=0,3 \text{ ml min}^{-1}$ por 12 h para criar um filme homogêneo. Este disco foi analisado por ATR-FTIR. A resolução dos espectros foi de 2 cm^{-1} entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} ; 64 espectros foram obtidos em cada aquisição.

O pré-processamento e análise dos espectros de fluorescência e infravermelho foram realizados no R V.3.4.1 com os pacotes eemR V.0.1.5., hyperSpec V.0.98.20161118 (Beleites and Sergo 2017) e corr2D V.0.2.0.

4.3.3 Resultados

Analizando os autopicos do diagrama de correlação homoespectral de espectros de fluorescência (Fig. 40), é possível afirmar que só uma porção da matéria orgânica (os componentes com um comprimento de onda relativo entre 300-350 nm que correspondem a ácidos húmicos) é afetada pela adição de ENRO. O outro componente, entre 200-250 nm, correspondente a proteínas não é afetado. Observa-se uma correlação positiva, ou seja, aumenta a intensidade quando aumenta a concentração de carbono orgânico. O autopico encontrasse concentrado unicamente na região da maior transição eletrônica, que possui um GAP grande, que é pouco perturbado, o que pode indicar um problema de sensibilidade.

O espectro de correlação 2D síncrono homoespectral para dados de ATR-FTIR (Figura 41) mostra uma correlação positiva entre 400 e 600 cm^{-1} , uma zona não muito informativa para MOD pois geralmente nesta zona a informação do FTIR é sobre minérios, principalmente enlaces Si-O, é necessário um refinamento adicional na resolução para melhor identificar os autopicos.

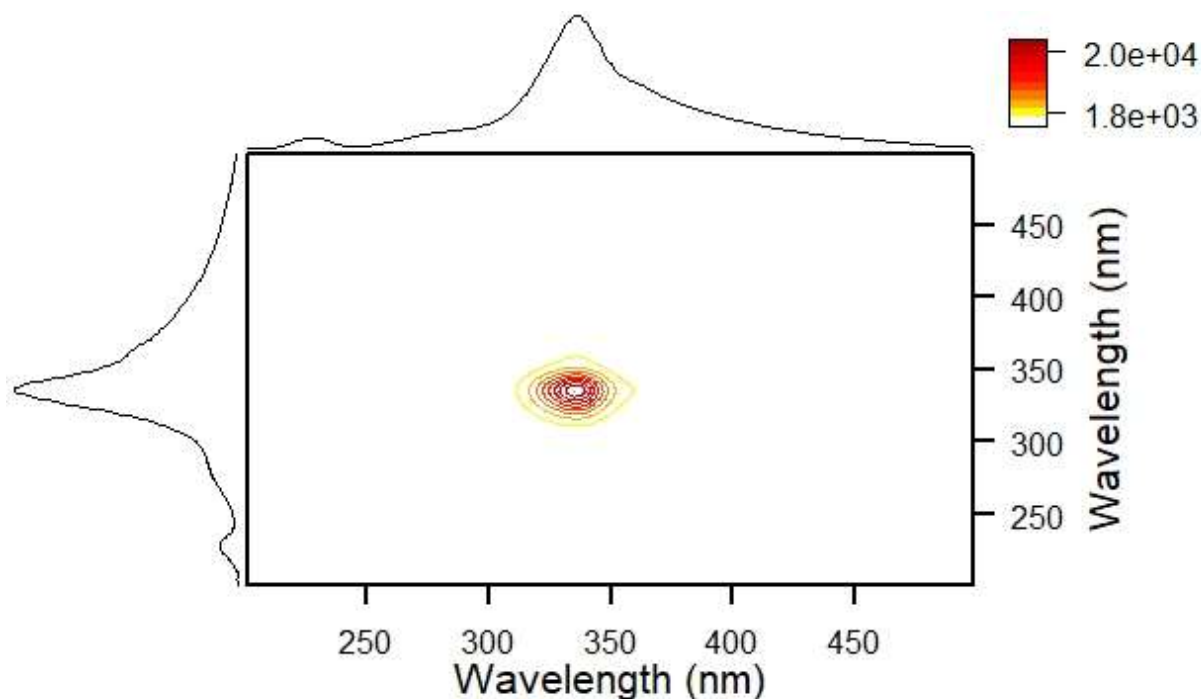


Figura 40: Espectro de correlação 2D síncrono homoespectral para dados de fluorescência sincronizada de matéria orgânica dissolvida obtida no fim da coluna no experimento de transporte de cama de frango (A2) em solo LVAd.

A figura 42 apresenta o mapa 2D-COS síncrono-heteroespectral para MOD com ENRO, ou seja, o que combina as duas técnicas. A partir da análise dos autopicos, é possível concluir que as interações entre a ENRO e o componente ácido húmico ($\lambda \sim 310\text{-}360\text{ nm}$, espectro de fluorescência sincronizado, eixo y) são pouco específicas, o que faz sentido levando em conta que as interações entre compostos orgânicos pouco polares ou apolares são geralmente fracas, do tipo van der Waals ou de dispersão de London. Recentemente foram observadas com esta técnica de 2D-COS interações devidas às estruturas cetônicas aromáticas ($\nu \sim 1400\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) dos ácidos húmicos (Xie et al. 2017) e, na porção fúlvica e proteica do MOD, interações por meio do alongamento alifático de C-OH e CO das estruturas de polissacarídeos (Tang et al. 2019). É necessário um cuidado ao analisar estes heteroespectros, pois se estão comparando sinais de ordem de grandeza diferentes, a de fluorescência (transições eletrônicas) com as sinais de infravermelho (transições vibracionais), é esperado o domínio da transição eletrônica conforme mostra a figura 42.

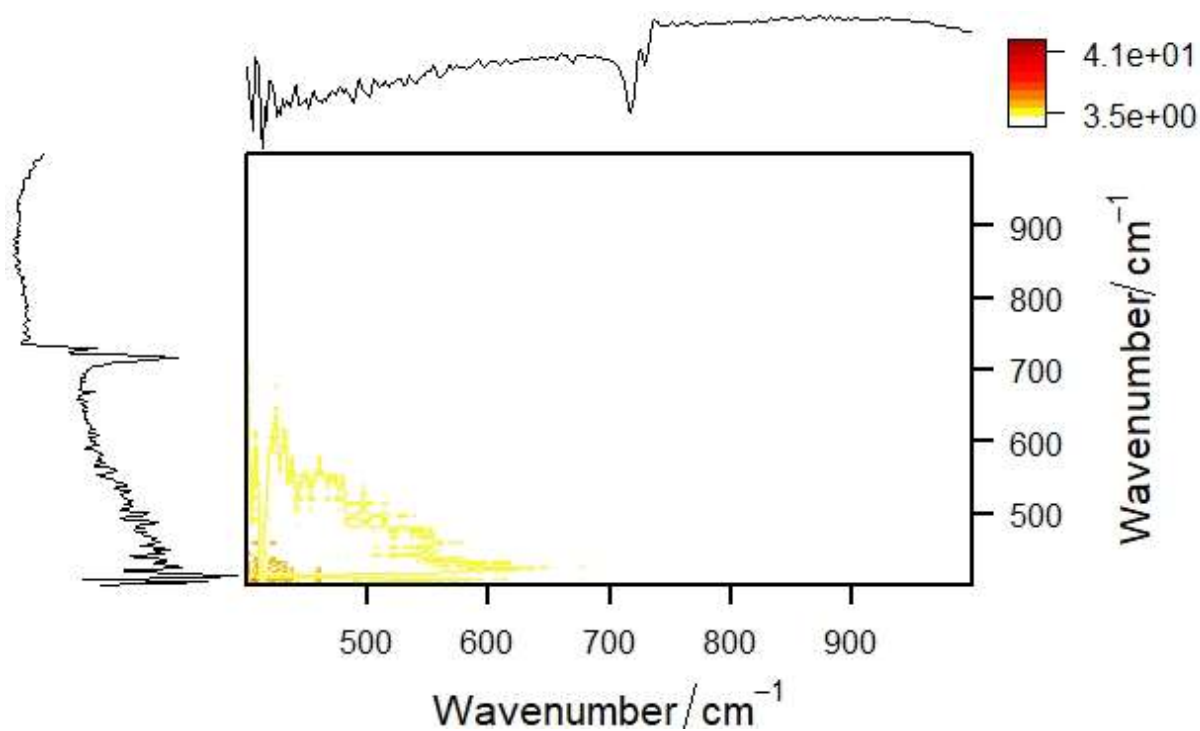


Figura 41: Espectro de correlação 2D síncrono homoespectral para dados de ATR-FTIR de matéria orgânica dissolvida obtida no fim da coluna no experimento de transporte de cama de frango (A2) em solo LVAd.

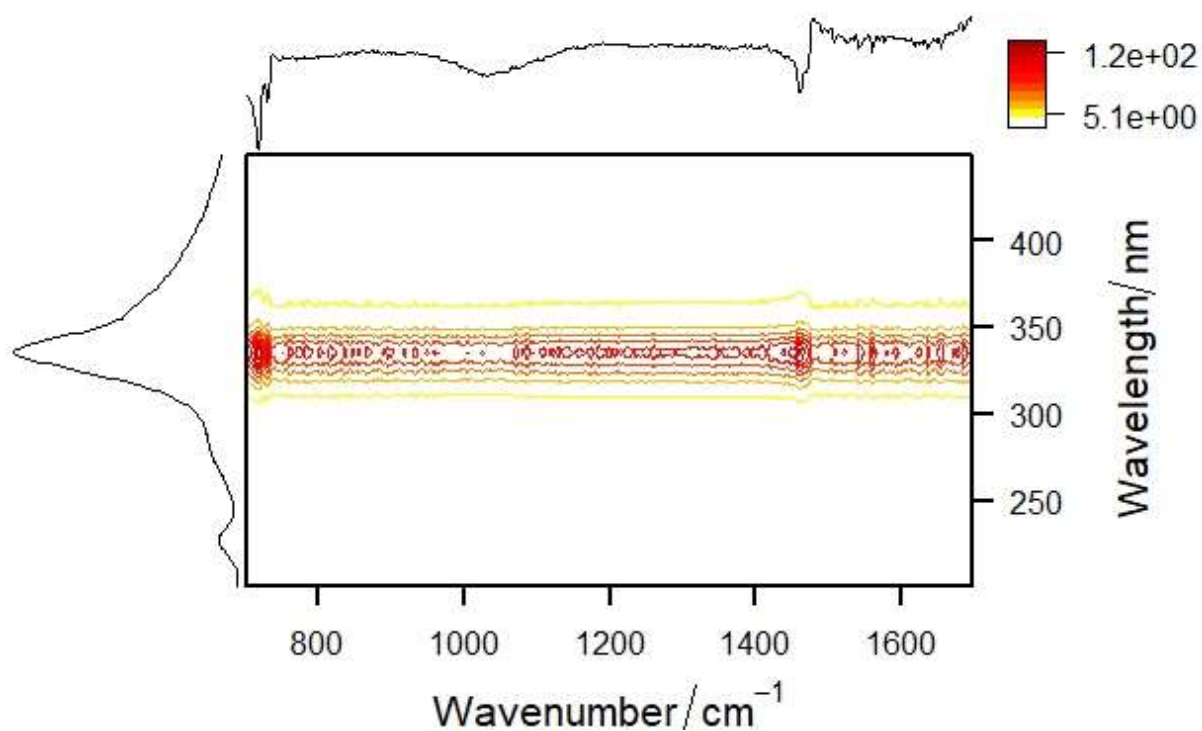


Figura 42: Mapa síncrono de 2DCOS gerados a partir das regiões de espectros de fluorescência entre 200–400nm e espectros de FTIR na região de 1750–700 cm^{-1} de

matéria orgânica dissolvida obtida no fim da coluna no experimento de transporte de cama de frango (A2) em solo LVAd.

Os espectros de correlação assíncronos (parte imaginária) não são apresentados devido à dificuldade de interpretação dos gráficos aplicada a este tipo de amostras ambientais complexas. Ainda seriam necessários mais experimentos para melhorar a razão sinal/ruído. Propõe-se, por exemplo, a obtenção de mais espectros de IR, porém, através da secagem controlada sobre o cristal de ATR de um volume específico de amostra. Das figuras 41 e 42 é possível afirmar que o ruído é relativamente alto e ainda dá para observar alguns picos provenientes da base de PTFE, o que pode afetar a análise, mesmo sendo subtraído o branco.

5 Conclusões Gerais

É de reconhecer que a análise de risco, estudado somente de forma “científica”, não pode, em alguns casos, prover de toda a informação com a qual o gerenciamento do risco e as tomadas de decisão devem se basear. Sendo assim, frequentemente, entre outros fatores relevantes, devem se levar em conta nos estudos científicos os fatores sociais, econômicos, climáticos-ambientais e o benefício de animais e do consumidor de produtos animais. O modelo qualitativo proposto permite identificar as áreas que são mais vulneráveis à poluição por antimicrobianos utilizados, em criação de frango e gado, como promotores de crescimento e agentes anticoccidianos no Brasil. Observando-se os resultados é possível mostrar que a vulnerabilidade das águas subterrâneas é maior do que para os solos e que as regiões centro-oeste, sul e sudeste concentram as áreas mais potencialmente poluídas. O método incorpora diversas fontes de informações e procedimentos que podem ser usados na definição de compostos de interesse com maior probabilidade de poluir o meio ambiente, bem como as regiões nas quais a poluição é mais provável. O modelo utiliza dados relativamente simples e disponíveis de fontes oficiais que foram pouco usados anteriormente em conjunto para fim de modelagem do risco. Embora simples, a abordagem qualitativa baseada nos piores cenários pode ser usada em pesquisas futuras como uma maneira de definir possíveis locais experimentais de amostragem, onde a análise quantitativa pode ser realizada para uma avaliação de risco mais aprofundada. A análise proposta pode ser usada como base para futuros trabalhos e modelos em SIG, com mais resolução, em áreas estratégicas, e pode ser útil para um futuro programa de monitoramento e vigilância. Há uma grande falta de dados sobre comercialização e uso de produtos veterinários que precisam ser superados com a ajuda da indústria e do governo. O aumento de dados quanto à persistência e adsorção de produtos farmacêuticos em solos brasileiros também seria necessário para melhorar modelos com potencial preditivo. Os melhores modelos poderiam, portanto, ser usados nos cenários de tomada de decisão, a fim de mitigar o risco de resíduos farmacêuticos.

O estudo experimental do transporte numa escala de laboratório, do tamanho de colunas de solo, foi feito levando em conta um modelo de cotransporte. A adição de

coloides da cama de frango torna mais complexo tanto o trabalho experimental quanto o de análise numérica. A adição de matéria orgânica ao sistema solo-água no experimento em fluxo cria um sistema multi-matrizes. Para extrair e quantificar os analitos foi então desenvolvido um novo método baseado na partição sólido-líquido com separação pelo efeito *salting-out* e limpeza das amostras por microextração em fase sólida dispersiva. Este método QuEChERS modificado mostrou-se eficiente para os fins propostos e mostra uma grande versatilidade, sendo possível, através do planejamento de experimentos, otimizar a eficiência de recuperação para diferentes analitos em matriz complexa, produto de misturas água-solo-coloides de cama de frango. Após o desenvolvimento experimental foi possível realizar o estudo tanto da matéria orgânica como dos fármacos ENRO e CIPRO.

O cotransporte dos fármacos junto com a matéria orgânica dissolvida revelou-se bastante complexo. Observou-se uma forte dependência com as características físicas e químicas dos solos, bem como resultados muito divergentes quando comparados com os resultados obtidos de um desenho do experimento de transporte onde só se enriquece uma quantidade de substrato ou uma porção de solo com o padrão de fármaco. Foi comprovado o cotransporte dos fármacos junto com coloides da matéria orgânica de cama de frango, o que tem implicações importantes na análise de risco ambiental, pois, se não se leva em conta este cotransporte, a mobilidade e reatividade destes compostos pode ser amplamente subestimada. Os resultados realçam a importância de entender as rotas de chegada dos poluentes aos compartimentos ambientais. Se os fármacos chegam junto com quantidades importantes de matéria orgânica, é imprescindível rever os experimentos para incluir estes novos componentes na configuração dos experimentos. O estudo do transporte e reatividade da matéria orgânica será ainda por muito tempo um grande desafio. Porém, este trabalho se soma a muitos outros onde é mostrado o potencial de técnicas simples, econômicas, com alto potencial de amostragem, como são as espectroscópicas, que, junto com métodos quimiométricos como PARAFAC permitem um estudo rápido de componentes da matéria orgânica dissolvida, permitindo refinar modelos de cotransporte. Um refinamento adicional pode vir de estudos de correlação bidimensional, onde uma perturbação na relação entre concentração de poluente e matéria orgânica pode ser estudada por meio de um gráfico bidimensional, produto de uma ou duas técnicas instrumentais. A análise dos diagramas de correlação para o

estudo de interação constitui ainda um desafio devido à complexidade da matéria orgânica natural. Porém, com o passar do tempo e a realização de mais experimentos pode se chegar a um nível de consenso assim como existe agora na aplicação da técnica PARAFAC. Justifica-se, por meio dos resultados obtidos, a continuação do trabalho por outros pesquisadores que queiram aprofundar mais no entendimento dos processos de transformação e transporte dos componentes de outros tipos de matéria orgânica em outras classes de solos. Nesta matéria orgânica, como comprovado pelo estudo de composição pela técnica de PARAFAC, existem componentes relacionados a bactérias e proteínas. Estes podem ser estudados como poluentes, pois nesta fração existem, além de parte dos resíduos de antimicrobianos, os genes de resistência.

6 Referências

- ABPA (2017) 2017 Annual Report - Brazilian Association of Animal Protein (ABPA)
- Ammari F, Bendoula R, Jouan-Rimbaud Bouveresse D, Rutledge DN, Roger J-M (2014) 3D front face solid-phase fluorescence spectroscopy combined with Independent Components Analysis to characterize organic matter in model soils. *Talanta* 125:146–152. doi: [10.1016/j.talanta.2014.02.049](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.049)
- Barry DA (2009) Effect of nonuniform boundary conditions on steady flow in saturated homogeneous cylindrical soil columns. *Advances in Water Resources* 32:522–531. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.advwatres.2009.01.003>
- Beleites C, Sergo V (2017) hyperSpec: a package to handle hyperspectral data sets in R
- Blackwell PA, Holten Lützhøft H-C, Ma H-P, Halling-Sørensen B, Boxall AB, Kay P (2004) Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. *Talanta* 64:1058–1064. doi: [10.1016/j.talanta.2004.05.006](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.05.006)
- Bragança I, Plácido A, Paíga P, Domingues VF, Delerue-Matos C (2012) QuEChERS: a new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *The Science of the total environment* 433:281–289. doi: [10.1016/j.scitotenv.2012.06.035](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.035)
- Brandt KK, Amézquita A, Backhaus T, Boxall A, Coors A, Heberer T, Lawrence JR, Lazorchak J, Schönfeld J, Snape JR, Zhu Y-G, Topp E (2015) Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. *Environment international* 85:189–205. doi: [10.1016/j.envint.2015.09.013](https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.013)
- Brimble MA (2003) Polyether Antibiotics. In: Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA
- Chabauty F, Pot V, Bourdat-Deschamps M, Bernet N, Labat C, Benoit P (2016) Transport of organic contaminants in subsoil horizons and effects of dissolved organic matter related to organic waste recycling practices. *Environmental Science and Pollution Research* 23:6907–6918. doi: [10.1007/s11356-015-5938-9](https://doi.org/10.1007/s11356-015-5938-9)

Chapman HD, Jeffers TK, Williams RB (2010) Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry science* 89:1788–801. doi: [10.3382/ps.2010-00931](https://doi.org/10.3382/ps.2010-00931)

Chefetz B, Xing B (2009) Relative Role of Aliphatic and Aromatic Moieties as Sorption Domains for Organic Compounds: A Review. *Environmental Science & Technology* 43:1680–1688. doi: [10.1021/es803149u](https://doi.org/10.1021/es803149u)

Conrad O, Bechtel B, Bock M, Dietrich H, Fischer E, Gerlitz L, Wehberg J, Wichmann V, Böhner J (2015) System for Automated Geoscientific Analyses (SAGA) v. 2.1.4. *Geoscientific Model Development* 8:1991–2007. doi: [10.5194/gmd-8-1991-2015](https://doi.org/10.5194/gmd-8-1991-2015)

Daouk S, Frege C, Blanc N, Mounier S, Redon R, Merdy P, Lucas Y, Pfeifer H-R (2015) Fluorescence spectroscopy to study dissolved organic matter interactions with agrochemicals applied in Swiss vineyards. *Environmental Science and Pollution Research* 22:9284–9292. doi: [10.1007/s11356-015-4086-6](https://doi.org/10.1007/s11356-015-4086-6)

De Jonge E, Van Der Loo M (2013) An introduction to data cleaning with R

Delle Site A (2001) Factors Affecting Sorption of Organic Compounds in Natural Sorbent/Water Systems and Sorption Coefficients for Selected Pollutants. A Review. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 30:187. doi: [10.1063/1.1347984](https://doi.org/10.1063/1.1347984)

EC (2003) Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition

Ellerbrock RH, Gerke HH (2013) Chapter Three – Characterization of Organic Matter Composition of Soil and Flow Path Surfaces Based on Physicochemical Principles—A Review. In: *Advances in agronomy*. pp 117–177

EMA (2008) Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38. EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1. 77

EMBRAPA (2013) Sistema Brasileiro de Classificação de Solos

FAO (2017) FAOSTAT

Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, Silva EGP da, Portugal LA, Reis PS dos, Souza AS, Santos WNL dos (2007) Box-Behnken

design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta* 597:179–86. doi: [10.1016/j.aca.2007.07.011](https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011)

Fontes MPF, Alleoni LRF (2006) Electrochemical attributes and availability of nutrients, toxic elements, and heavy metals in tropical soils. *Scientia Agricola* 63:589–608

Fontes MPF, Weed SB (1991) Iron Oxides in Selected Brazilian Oxisols: I. Mineralogy. *Soil Science Society of America Journal* 55:1143. doi: [10.2136/sssaj1991.03615995005500040040x](https://doi.org/10.2136/sssaj1991.03615995005500040040x)

Fu Q-L, He J-Z, Blaney L, Zhou D-M (2016) Roxarsone binding to soil-derived dissolved organic matter: Insights from multi-spectroscopic techniques. *Chemosphere* 155:225–233. doi: [10.1016/j.chemosphere.2016.04.033](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.033)

Gu C, Karthikeyan K, Sibley SD, Pedersen JA (2007) Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere* 66:1494–1501. doi: [10.1016/j.chemosphere.2006.08.028](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.028)

Guo C, Wang M, Xiao H, Huai B, Wang F, Pan G, Liao X, Liu Y (2016) Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 1027:110–118. doi: [10.1016/j.jchromb.2016.05.034](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.034)

Hahn L (2004) Processamento da cama de aviário e suas implicações nos agroecossistemas. PhD thesis, Universidade Federal de Santa Catarina.

Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25:1965–1978. doi: [10.1002/joc.1276](https://doi.org/10.1002/joc.1276)

Huang M, Li Z, Huang B, Luo N, Zhang Q, Zhai X, Zeng G (2018) Investigating binding characteristics of cadmium and copper to DOM derived from compost and rice straw using EEM-PARAFAC combined with two-dimensional FTIR correlation analyses. *Journal of Hazardous Materials* 344:539–548. doi: [10.1016/J.JHAZMAT.2017.10.022](https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.10.022)

Hussain SA, Prasher SO (2011) Understanding the Sorption of Ionophoric Pharmaceuticals in a Treatment Wetland. *Wetlands* 31:563–571. doi: [10.1007/s13157-011-0171-x](https://doi.org/10.1007/s13157-011-0171-x)

IBGE (2015) Rebanho bovino brasileiro cresce e chega a 212,3 milhões de cabeças de gado — Portal Brasil

IBGE (2016) Produção da pecuária municipal - 2015. Rio de Janeiro

IGBP-DIS (1998) SoilData(V.0) A program for creating global soil-property databases

ISO (2011) BS EN ISO 15175:2011. Soil quality—characterization of soil related to groundwater protection. 66

Kolpin D, Silberhorn E, Boxall A, Servos M, Metcalfe C, Staveley J, Fenner K (2008) Exposure Assessment of Veterinary Medicines in Aquatic Systems. In: Veterinary medicines in the environment. CRC Press, pp 57–96

Kothawala DN, Murphy KR, Stedmon CA, Weyhenmeyer GA, Tranvik LJ (2013) Inner filter correction of dissolved organic matter fluorescence. *Limnology and Oceanography: Methods* 11:616–630. doi: [10.4319/lom.2013.11.616](https://doi.org/10.4319/lom.2013.11.616)

Kümmerer K (2008) Pharmaceuticals in the Environment – A Brief Summary. In: Pharmaceuticals in the environment. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 3–21

LAPIG, 2018. LAPIG-maps. [WWW Document]. URL. <http://maps.lapig.iesa.ufg.br/lapig.html>, Accessed date: 11 March 2018.

Lawaetz AJ, Stedmon CA (2009) Fluorescence Intensity Calibration Using the Raman Scatter Peak of Water. *Applied Spectroscopy* 63:936–940. doi: [10.1366/000370209788964548](https://doi.org/10.1366/000370209788964548)

Leal RMP, Figueira RF, Tornisiello VL, Regitano JB (2012) Occurrence and sorption of fluoroquinolones in poultry litters and soils from São Paulo State, Brazil. *Science of The Total Environment* 432:344–349. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.002](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.002)

Lewis J, Sjöström J (2010) Optimizing the experimental design of soil columns in saturated and unsaturated transport experiments. *Journal of Contaminant Hydrology* 115:1–13. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.04.001](https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.04.001)

Liang S, Lu L, Meng F (2017) DOM-mediated membrane retention of fluoroquinolone as revealed by fluorescence quenching properties. *Scientific Reports* 7:5372. doi: [10.1038/s41598-017-05635-z](https://doi.org/10.1038/s41598-017-05635-z)

Limousin G, Gaudet J-P, Charlet L, Szenknect S, Barthès V, Krimissa M (2007) Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry* 22:249–275. doi: [10.1016/j.apgeochem.2006.09.010](https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.09.010)

Liu L, Song C, Yan Z, Li F (2009) Characterizing the release of different composition of dissolved organic matter in soil under acid rain leaching using three-dimensional excitation–emission matrix spectroscopy. *Chemosphere* 77:15–21. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.026>

Mao J, Ding G, Xing B (2002) Domain mobility of humic acids investigated with one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance: support for dual-mode sorption model. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33:1679–1688. doi: [10.1081/CSS-120004308](https://doi.org/10.1081/CSS-120004308)

MAPA (2015) ADITIVOS MELHORADORES DE DESEMPENHO E ANTICOCCIDIANOS REGISTRADOS NA CPAA/DFIP

Marcucci MT, Toma HS, Santos MDD, Romero, Jakeline Vieira Monteiro Toma CD, Carvalho A de M, Camargo LM de (2014) Efeito do aditivo Monensina sódica no metabolismo ruminal de bovinos de corte. *Revista Científica de Medicina Veterinária* 22:

Martínez-Mejía MJ, Sato I, Rath S (2017) Sorption mechanism of enrofloxacin on humic acids extracted from Brazilian soils. *Environmental Science and Pollution Research* 24:15995–16006. doi: [10.1007/s11356-017-9210-3](https://doi.org/10.1007/s11356-017-9210-3)

Masoom H, Courtier-Murias D, Farooq H, Soong R, Kelleher BP, Zhang C, Maas WE, Fey M, Kumar R, Monette M, Stronks HJ, Simpson MJ, Simpson AJ (2016) Soil Organic Matter in Its Native State: Unravelling the Most Complex Biomaterial on Earth. *Environmental Science & Technology* 50:1670–1680. doi: [10.1021/acs.est.5b03410](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03410)

Massicotte P (2017) eemR: Tools for Pre-Processing Emission-Excitation-Matrix (EEM) Fluorescence Data

Matthias P, Daniel G (2018) staRdom: PARAFAC analysis on DOM EEMs, calculating absorbance slopes. UFZ Leipzig, Lunz, Austria

Melo VF, Fontes MPF, Novais RF, Singh B, Schaefer CEGR (2001) Características dos óxidos de ferro e de alumínio de diferentes classes de solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 25:19–32. doi: [10.1590/S0100-06832001000100003](https://doi.org/10.1590/S0100-06832001000100003)

Mentem JFM, Pereira R (2017) Experimento de antibioterapia em frangos com Enrofloxacin. Departamento de Zootecnia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

Minor EC, Swenson MM, Mattson BM, Oyler AR (2014) Structural characterization of dissolved organic matter: a review of current techniques for isolation and analysis. *Environ Sci: Processes Impacts* 16:2064–2079. doi: [10.1039/C4EM00062E](https://doi.org/10.1039/C4EM00062E)

Montagner CC, Vidal C, Acayaba R (2017) Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Química Nova* 40:1094–1110. doi: [10.21577/0100-4042.20170091](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091)

Murphy KR, Stedmon CA, Graeber D, Bro R (2013) Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. *PARAFAC. Analytical Methods* 5:6557. doi: [10.1039/c3ay41160e](https://doi.org/10.1039/c3ay41160e)

Narvaez V. JF, Jimenez C. C (2012) Pharmaceutical products in the environment: sources, effects and risks. *Vitae* 19:93–108

Nebbioso A, Piccolo A (2013) Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405:109–124. doi: [10.1007/s00216-012-6363-2](https://doi.org/10.1007/s00216-012-6363-2)

Neteler M, Bowman MH, Landa M, Metz M (2012) GRASS GIS: A multi-purpose open source GIS. *Environmental Modelling & Software* 31:124–130. doi: [10.1016/j.envsoft.2011.11.014](https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2011.11.014)

Noda I, Ozaki Y (2005) Principle of Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. In: *Two-dimensional correlation spectroscopy - applications in vibrational and optical spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp 15–38

OECD (2004) Test No. 312. Leaching in Soil Columns. 1–15

Ohno T, Amirbahman A, Bro R (2008) Parallel Factor Analysis of Excitation–Emission Matrix Fluorescence Spectra of Water Soluble Soil Organic Matter as Basis for the Determination of Conditional Metal Binding Parameters. *Environmental Science & Technology* 42:186–192. doi: [10.1021/es071855f](https://doi.org/10.1021/es071855f)

Oliviera IB, Demond AH, Salehzadeh A (1996) Packing of Sands for the Production of Homogeneous Porous Media. *Soil Sci Soc Am J* 60:49–53

O'Neill J (2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance, London

O'Neill J (2015) Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste

Park Y, Noda I, Jung YM (2016) Novel developments and applications of two-dimensional correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 1124:11–28. doi: [10.1016/j.molstruc.2016.01.028](https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.01.028)

Pereira L, Jardim I, Fostier A, Rath S (2012) Occurrence, behavior and environmental impacts caused by the presence of veterinary antimicrobials in soils | Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. *Quimica Nova* 35: doi: [10.1590/S0100-40422012000100028](https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100028)

Peruchi LM, Fostier AH, Rath S (2015) Sorption of norfloxacin in soils: analytical method, kinetics and Freundlich isotherms. *Chemosphere* 119:310–7. doi: [10.1016/j.chemosphere.2014.06.008](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.008)

Pignatello JJ (2012) Dynamic interactions of natural organic matter and organic compounds. *Journal of Soils and Sediments* 12:1241–1256. doi: [10.1007/s11368-012-0490-4](https://doi.org/10.1007/s11368-012-0490-4)

Plazinski W, Dziuba J, Rudzinski W (2013) Modeling of sorption kinetics: the pseudo-second order equation and the sorbate intraparticle diffusivity. *Adsorption* 19:1055–1064. doi: [10.1007/s10450-013-9529-0](https://doi.org/10.1007/s10450-013-9529-0)

Plazinski W, Rudzinski W, Plazinska A (2009) Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 152:2–13. doi: [10.1016/j.cis.2009.07.009](https://doi.org/10.1016/j.cis.2009.07.009)

Rassam D, Šimůnek J, Mallants D, Van Genuchten MT (2018) The HYDRUS-1D Software Package for Simulating the One-Dimensional Movement of Water, Heat, and Multiple Solutes in Variably-Saturated Media: Tutorial. CSIRO, Adelaide

Rath S, Fostier AH, Pereira LA, Dioniso AC, de Oliveira Ferreira F, Doretto KM, Maniero Peruchi L, Viera A, de Oliveira Neto OF, Dal Bosco SM, Martínez-Mejía MJ

(2019) Sorption behaviors of antimicrobial and antiparasitic veterinary drugs on subtropical soils. *Chemosphere* 214:111–122. doi: [10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.09.083](https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.09.083)

R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

Rocha DG, Santos FA, Augusti R, Faria AF (2015) Application of a 3 3 Box-Behnken Design to Optimize the Extraction of Eleven Fluoroquinolones from Poultry Muscle and Kidney Using a QuEChERS Approach via Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: the Easy Use of Microsoft Excel in Multivariate An. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27:221–226. doi: [10.5935/0103-5053.20150264](https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150264)

Salvia M-V, Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Cren-Olivé C (2012) Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *Journal of chromatography A* 1245:122–33. doi: [10.1016/j.chroma.2012.05.034](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.034)

Sartori A, Genovez AM, Neto FL (2005) Classificação Hidrológica de Solos Brasileiros para a Estimativa da Chuva Excedente com o Método do Serviço de Conservação do Solo dos Estados Unidos Parte 1: Classificação. *RBRH - Revista Brasileira de Recursos Hídricos* 10:5–18

Sharpless CM, Blough NV (2014) The importance of charge-transfer interactions in determining chromophoric dissolved organic matter (CDOM) optical and photochemical properties. *Environmental Science: Processes & Impacts* 16:654. doi: [10.1039/c3em00573a](https://doi.org/10.1039/c3em00573a)

Singer AC, Shaw H, Rhodes V, Hart A (2016) Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Frontiers in microbiology* 7:1728. doi: [10.3389/fmicb.2016.01728](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728)

Slana M, Pahor V, Cvitkovič-Maričič L, Sollner-Dolenc M (2014) Excretion pattern of enrofloxacin after oral treatment of chicken broilers. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 37:611–614. doi: [10.1111/jvp.12130](https://doi.org/10.1111/jvp.12130)

Slana M, Sollner-Dolenc M (2016) Enrofloxacin degradation in broiler chicken manure under various laboratory conditions. *Environmental Science and Pollution Research* 23:4422–4429. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5624-y>

Sleighter RL, Hatcher PG (2007) The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter. *Journal of Mass Spectrometry* 42:559–574. doi: [10.1002/jms.1221](https://doi.org/10.1002/jms.1221)

Stedmon CA, Bro R (2008) Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography: Methods* 6:572–579. doi: [10.4319/lom.2008.6.572](https://doi.org/10.4319/lom.2008.6.572)

Šimůnek J, Genuchten M van, Šejna M (2008) The HYDRUS-1D software package for simulating the one-dimensional movement of water, heat, and multiple solutes in variably-saturated media, Version 4.0. Department of Environmental Sciences, University of California Riverside, Riverside, California, USA

Šimůnek J, He C, Pang L, Bradford SA (2006) Colloid-Facilitated Solute Transport in Variably Saturated Porous Media. *Vadose Zone Journal* 5:1035. doi: [10.2136/vzj2005.0151](https://doi.org/10.2136/vzj2005.0151)

Šimůnek J, Šejna M, Van Genuchten MT (2015) The C-Ride Module for HYDRUS-1D. Simulating One-Dimensional Colloid-Facilitated Solute Transport in Variably-Saturated Porous Media. PC Progress, Prague, Czech Republic

Tang J, Zhuang L, Yu Z, Liu X, Wang Y, Wen P, Zhou S (2019) Insight into complexation of Cu(II) to hyperthermophilic compost-derived humic acids by EEM-PARAFAC combined with heterospectral two dimensional correlation analyses. *Science of The Total Environment* 656:29–38. doi: [10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.357](https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.357)

Torre A de la, Iglesias I, Carballo M, Ramírez P, Muñoz MJ (2012) An approach for mapping the vulnerability of European Union soils to antibiotic contamination. *The Science of the total environment* 414:672–9. doi: [10.1016/j.scitotenv.2011.10.032](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.10.032)

USDA (2017) Soil Survey Manual. United States Department of Agriculture Handbook No. 18

USEPA (2008) Fate , Transport and Transformation Test Guidelines, Aerobic Soil Metabolism, Anaerobic Soil Metabolism

Valencia S, Marín JM, Restrepo G, Frimmel FH (2014) Evaluation of natural organic matter changes from Lake Hohloh by three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy during TiO₂/UV process. *Water Research* 51:124–133. doi: [10.1016/j.watres.2013.12.019](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.12.019)

Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:5649–54. doi: [10.1073/pnas.1503141112](https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112)

Vaz S, Lopes WT, Martin-Neto L (2015) Study of molecular interactions between humic acid from Brazilian soil and the antibiotic oxytetracycline. *Environmental Technology & Innovation* 4:260–267. doi: [10.1016/j.eti.2015.09.004](https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.09.004)

Vera J, Correia-Sá L, Paíga P, Bragança I, Fernandes VC, Domingues VF, Delerue-Matos C (2013) QuEChERS and soil analysis. An Overview. *Sample Preparation* 1:54–77. doi: [10.2478/sampre-2013-0006](https://doi.org/10.2478/sampre-2013-0006)

Warmerdam F (2008) The Geospatial Data Abstraction Library. In: *Open source approaches in spatial data handling*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 87–104

WHO (2014) Antimicrobial Resistance: global report on surveillance. 2015

Wickham H (2009) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York

Wickham H, Francois R (2015) *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*

Xavier AC, King CW, Scanlon BR (2016) Daily gridded meteorological variables in Brazil (1980-2013). *International Journal of Climatology* 36:2644–2659. doi: [10.1002/joc.4518](https://doi.org/10.1002/joc.4518)

Xie P, Zhou L, Zhang Z, Ma J (2017) Contribution to the reduction-induced fluorescence enhancement of natural organic matter: Aromatic ketones outweigh quinones. *Luminescence* 32:1528–1534. doi: [10.1002/bio.3354](https://doi.org/10.1002/bio.3354)

Yopasa Arenas A, de Souza Pessôa G, Arruda MAZ, Fostier AH (2018) Mobility of polivinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in tropical soils. *Chemosphere* 194:543–552. doi: [10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.12.019](https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.12.019)

Yopasa-Arenas A, Fostier AH (2018a) Exposure of Brazilian soil and groundwater to pollution by coccidiostats and antimicrobial agents used as growth promoters. *Science of The Total Environment* 644:112–121. doi: [10.1016/J.SCITOTENV.2018.06.338](https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.06.338)

Yopasa-Arenas A, Fostier A-H (2018b) Mapping the exposure of Brazilian soil and groundwater to contamination by coccidiostats and growth promoters. *Mendeley Data* 1: doi: [10.17632/PD3RD836YT.1](https://doi.org/10.17632/PD3RD836YT.1)

Yu H, Liang H, Qu F, Han Z-s, Shao S, Chang H, Li G (2015) Impact of dataset diversity on accuracy and sensitivity of parallel factor analysis model of dissolved organic matter fluorescence excitation-emission matrix. *Scientific Reports* 5:10207. doi: [10.1038/srep10207](https://doi.org/10.1038/srep10207)

Zender CS (2008) Analysis of self-describing gridded geoscience data with netCDF Operators (NCO). *Environmental Modelling and Software* 23:1338–1342. doi: [10.1016/j.envsoft.2008.03.004](https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2008.03.004)

Zhou D, Thiele-Bruhn S, Arenz-Leufen MG, Jacques D, Lichtner P, Engelhardt I (2016) Impact of manure-related DOM on sulfonamide transport in arable soils. *Journal of Contaminant Hydrology* 192:118–128. doi: [10.1016/J.JCONHYD.2016.07.005](https://doi.org/10.1016/J.JCONHYD.2016.07.005)

Zhu L-J, Zhao Y, Chen Y-N, Cui H-Y, Wei Y-Q, Liu H-L, Chen X-M, Wei Z-M (2018) Characterization of atrazine binding to dissolved organic matter of soil under different types of land use. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147:1065–1072. doi: [10.1016/J.ECOENV.2016.11.008](https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2016.11.008)

Zou Y, Zheng W (2013) Modeling manure colloid-facilitated transport of the weakly hydrophobic antibiotic florfenicol in saturated soil columns. *Environmental Science & Technology* 47:5185–5192. doi: [10.1021/es400624w](https://doi.org/10.1021/es400624w)

7 ANEXOS

Tabela A1: Parâmetros específicos do solo

| Parâmetro | Notação | Valor inicial | Valor final | Descrição |
|-----------|---------------|--|--|--|
| Bulk.D. | ρ | 0,8 g cm ⁻³ (LVAd); 1,2 g cm ⁻³ (Rqo) | - | Densidade aparente [M L ⁻³] |
| Disp. | λ_L | 0 | 0,74 cm (LVAd); 0 (RQo) | Dispersividade longitudinal [L] |
| Fract. | f | 0 | 0,0254 (LVAd); 0 (RQo) | Fração dos sítios de sorção em equilíbrio com a solução [-] |
| ThImob. | θ_{im} | 0.28 (Rqo); 0,52 (LVAd) | 0,32 ± 0,06 (RQo); 0,64 ± 0.07 (LVAd) | Conteúdo de água imóvel. No módulo C-Ride, este parâmetro pode ser usado para expressar a exclusão de coloide (fração de água da qual os coloides são excluídos). O conteúdo de água imóvel para o terceiro componente (soluto) é em cada caso (inclusive quando se considera que os coloides são excluídos de alguma fração de água) considerado igual a zero |

Tabela A2: Parâmetros de reação para o primeiro componente (coloides).

| Parâmetro | Notação | Valor | | Descrição |
|-----------|------------|---------|---|---|
| | | inicial | Valor final | |
| Kd | K_d | 0 | - | Parâmetro reservado para o parâmetro de sorção Kd, que não é usado para transporte de coloide [$L^{-3}M$] |
| Nu | η | 0 | $0,53 \pm 0,05$ (LVAd); 0 (RQo) | η de Langmuir [$L^{-3} M$] |
| Beta | β | 1 | $0,55 \pm 0,05$ (LVAd); 0 (RQo) | Exponente β de Freundlich |
| Henry | K_H | 0 | - | Coefficiente da lei de Henry, que não é utilizada no transporte de coloide. |
| SNKL1 | μ_{cw} | 0 | $0,011 \pm 0,002$ (LVAd); 0 (RQo) | Imobilização do coloide na fase líquida (água imóvel) |
| SNKS1 | μ_{cs} | 0 | $0,79 \times 10^{-5} \pm 0,03 \times 10^{-5}$ (LVAd); 0 (RQo) | Imobilização do coloide na fase sólida |
| iPsi2 | - | 0 | 0 | Tipo de bloqueio nos sítios de sorção de segundo tipo (0= sem bloqueio, 1= dinâmica Langmuriana, 3= modelo de adsorção sequencial aleatória; 4= |

| | | | | |
|----------|-----------|------|--|---|
| | | | | coeficiente de bloqueio dependente da profundidade |
| iPsi1 | - | 0 | 0 | O mesmo para sítios de sorção de primeiro tipo |
| SMax2 | S_{max} | 0 | 0 | Parâmetro na função de bloqueio para os sítios de sorção de segundo tipo |
| AttachS2 | k_{ac} | 0 | $0,070 \pm 0,008 \text{ min}^{-1}$ (LVAd); $0,16 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ (RQo) | Coeficiente de deposição de primeira ordem para os sítios de sorção de segundo tipo k_{ac} (ou k_{str}) [T^{-1}] |
| DetachS2 | k_{dc} | 0 | $0,001 \pm 0,0002 \text{ min}^{-1}$ (LVAd); $0,17 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$ (RQo) | Coeficiente de desprendimento de primeiro ordem para os sítios de sorção de segundo tipo k_{dc} [T^{-1}] |
| SMax1 | S_{max} | 0 | 0 | Parâmetro na função de bloqueio para os sítios de sorção de primeiro tipo |
| AttachS1 | k_{ac} | 0,01 | $0,10 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ (LVAd); $0,012 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$ (RQo) | Coeficiente de deposição de primeiro ordem para os sítios de sorção de primeiro tipo k_{ac} (ou k_{str}) [T^{-1}] |
| DetachS1 | k_{dc} | 0,05 | $0,0075 \pm 0,0021 \text{ min}^{-1}$ (LVAd); $0,072 \pm 0,001 \text{ min}^{-1}$ (RQo) | Coeficiente de desprendimento de primeira ordem para os sítios de sorção de primeiro tipo k_{ac} (ou k_{str}) [T^{-1}] |

Tabela A3: Parâmetros de reação para o segundo componente (soluto nos coloides).

| Parâmetro computacional | Notação | Valor inicial | Valor final | Descrição |
|----------------------------|------------|------------------|------------------------------|---|
| Kd | K_d | 0 | 0 | Parâmetro reservado para o parâmetro de sorção Kd, que não é usado para transporte de coloide [$L^{-3}M$] |
| Nu | η | 0 | 0 | η de Langmuir [$L^{-3} M$] |
| Beta | β | 1 | 1 | Exponente β de Freundlich |
| Henry | K_H | 0 | 0 | Coeficiente da lei de Henry, que não é utilizada no transporte de coloide. |
| SinkL1 | μ_{cw} | 0 | 0,3 (LVAd); 0,05 (RQo) | Imobilização do coloide na fase líquida (água imóvel) |
| SinkS1 | μ_{cs} | 0 | 0,3 (LVAd); 0,05 (RQo) | Imobilização do coloide na fase sólida |
| ReflmCol | Ψ_i | NA | NA | Parâmetro que ajusta a taxa de sorção ao número de coloides imóveis presentes. |
| AttImCol | k_{aic} | NA | NA | Coeficiente da taxa de adsorção do soluto a coloides imóveis |
| DetImCol | k_{dic} | NA | NA | Coeficiente da taxa de dessorção do soluto desde coloides imóveis |

| | | | | |
|-----------|-----------|----|----|---|
| RefMobCol | ψ_m | NA | NA | Parâmetro que ajusta a taxa de sorção ao número de coloides presentes |
| AttMobCol | k_{amc} | NA | NA | Coeficiente da taxa de adsorção do soluto a coloides móveis |
| DetMobCol | k_{dmc} | NA | NA | Coeficiente da taxa de dessorção do soluto desde coloides móveis |

Tabela A4: Parâmetros de reação para o terceiro componente (soluto).

| Parâmetro computacional | Notação | Valor inicial | Valor final | Descrição |
|-------------------------|---------|--|-------------|---|
| Kd | Kd | ENRO: 2128 (LVAD); 780 (RQo) CIPRO: 2879 (LVAD); 1103 (RQo) | | Parâmetro de sorção Kd [L ⁻³ M]. |
| Nu | η | 0 | 0 | η de Langmuir [L ⁻³ M] |
| Beta | β | 1 | 1 | Exponente β de Freundlich |
| Henry | K_H | 0 | 0 | Coeficiente da lei de Henry |
| SinkL1 | μ_w | 0 | 0 | Taxa de degradação para o contaminante dissolvido na fase líquida [T ⁻¹]. |
| SinkS1 | μ_s | 0 | 0 | Taxa de degradação para o contaminante dissolvido na fase sólida [T ⁻¹]. |

| | | | | |
|-------|----------|---|---|--|
| Alpha | ω | 0 | 0 | Coeficiente de primeira ordem para adsorção em sitios de tipo um o dois em condições de não-equilíbrio [T ⁻¹]. |
|-------|----------|---|---|--|